UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Estudo do reaproveitamento de meio no cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*

Ana Lucía Morocho Jácome

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Tecnologia de Fermentações

São Paulo
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Morocho Jácome, Ana Lucía
M867e Estudo do reaproveitamento de meio no cultivo de *Arthrospira (Spirulina) platensis* / Ana Lucía Morocho Jácome. -- São Paulo, 2014.
143p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Carvalho, João Carlos Monteiro de

1. Microbiologia aplicada 2. Bioreator : Biotecnologia 3. Adsorção (Tratamento de água) 4. Floculação com coagulantes primários 5. Biomassa I. T. II. Carvalho, João Carlos Monteiro de, orientador.

660.6 CDD

Ana Lucía Morocho Jácome

Estudo do reaproveitamento de meio no cultivo de
Arthrospira (Spirulina) platensis

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
Orientador/Presidente

_____
1º. examinador

_____
2º. examinador

_____
3º. examinador

_____
4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de_____.

À minha amada família,

meu exemplo de perseverança.

AGRADECIMENTOS

Infinito reconhecimento a Deus, pela saúde, pelas oportunidades e pela sua graça sempre presente na minha vida.

Ao Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho, pelos ensinamentos, pelo apoio, e sobre tudo, pela paciência e amizade recebidos ao longo do meu doutorado.

Ao Prof. Tit. Adalberto Pessoa Júnior e ao Prof. Tit. Sunao Sato pela confiança depositada em meu trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Elza e Miriam (Secretaria-FBT), pela disponibilidade e ajuda.

Aos amigos pós-graduandos da FCF/USP, em especial, Camila Knysak, Ivan Ávila-León, João Vitor Dutra Molino, Lívia Seno Ferreira, Marcelo Chuei Matsudo, Mayla Santos Rodrigues, Raquel Pedrosa Bezerra, por compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio no laboratório e pelo companheirismo no trabalho.

Aos alunos da Iniciação Científica, Johanna Valenzuela, Guilherme Favaro Mascioli, pela disponibilidade e ajuda na parte experimental deste trabalho.

Aos meus amados pais, María Leonor Jácome e Jaime Bernardo Morocho, meu irmão, Jaime Patricio, aos meus sobrinhos Emily Mailyn e Jaime Mateo, e a todos os meus parentes, porque a pesar da distância, suas presenças incondicionais me apoiaram sempre.

Aos amigos equatorianos, Angélica Reyes, Edison Sotomayor, Gabriela Sarzosa, Guadalupe Pazmiño, Jenny Paucar, Jenny Salcedo, Judith e Alexandra Parra, Santiago Vaca, Silvia Clavijo e Tammia Chiriboga, que mesmo distantes, sempre me animaram e tiveram palavras de conforto nos momentos difíceis.

Aos amigos do Centro Cultural Butantã, especialmente, Alexander, Carlos, Javier, Márcia, Susanna, Sylvia, Regina, que com carinho, me animaram durante a pós-graduação.

Aos amigos da A. P. São João Batista, Aldo, Antônio, Beto, Eduardo, Erick, Flaviany, Giovana, Ingrid, Ivaneide, Jenny, Juan, Luiz, Nedher, Paty, Rosita, Sandra, Thaiomara, Tiemi, pelo apoio durante a caminhada.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais na Faculdade de Ciências Químicas da Universidad Central del Ecuador, Profa. Dra. Ximena Chiriboga e Prof. Dr. Patricio Miño, pelo apoio no começo da minha vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processos 2010/52073-3, 2011/52028-0), pelo apoio financeiro que permitiu a execução desse trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento desta pesquisa.

El heroísmo del trabajo está en “acabar” cada tarea.

(S. Josemaría Escrivá, Surco, n. 488)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS 12
LISTA DE GRÁFICOS 13
LISTA DE QUADROS 15
LISTA DE TABELAS 16
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 18
LISTA DE SÍMBOLOS 19
RESUMO EM PORTUGUÊS 21
RESUMO EM INGLÊS 22
RESUMO EM ESPANHOL 23

1 INTRODUÇÃO 24

2 REVISÃO DA LITERATURA 27

2.1 ***Arthrospira sp.*** 28
2.1.1 Classificação e morfologia 29
2.1.2 Condições de cultivo 29
2.1.2.1 *Fonte de nitrogênio* 29
2.1.2.2 *pH* 31
2.1.2.3 *Temperatura* 32
2.1.2.4 *Luz* 33
2.1.3 Propriedades 34
2.1.4 Produção e Aplicações 34
2.1.4.1 *Suplemento alimentar* 35
2.1.4.2 *Alimentação animal* 36
2.1.4.3 *Tratamento de efluentes* 37
2.2 ***Processo de cultivo*** 37
2.3 ***Reaproveitamento de meio*** 38
2.3.1 Floculação com agentes químicos 39
2.3.2 Adsorção por carvão ativado 40

2.3.2.1 *Adsorção em carvão ativado granulado (CAG)* 41
2.3.2.2 *Adsorção em carvão ativado em pó (CAP)* 42
2.3.3 Remoção de matéria orgânica e pigmentos 45
2.3.3.1 *Remoção de matéria orgânica* 45
2.3.3.1.1 Controle de pH 46
2.3.3.1.2 Otimização da quantidade de coagulante 47
2.3.3.1.3 Abrandamento com coagulante 47
2.3.3.2 *Remoção de pigmentos* 48
2.3.4 Métodos de separação em cultivos de cianobactérias 48
2.3.4.1 *Processos Químicos* 48
2.3.4.1.1 Floculação 48
2.3.4.2 *Processos Mecânicos* 49
2.3.4.2.1 Centrifugação 49
2.3.4.2.2 Filtração 49
2.3.4.2.3 Sedimentação 50
2.3.4.2.4 Flotação por ar dissolvido (FAD) 50
2.3.4.3 *Processos Elétricos* 51
2.3.4.4 *Processos Biológicos* 52
2.3.4.5 *Outras alternativas* 52

3 OBJETIVOS 53

4 MATERIAL E MÉTODOS 54

4.1 ***Micro-organismo*** 54
4.2 ***Meios de cultivo*** 54
4.3 ***Inóculo*** 55
4.4 ***Experimentos realizados*** 56
4.4.1 Obtenção de meio de cultivo 56
4.4.1.1 *Meio obtido a partir de processo em batelada alimentada* 56
4.4.1.2 *Meio obtido a partir do processo contínuo* 56
4.4.2 Tratamentos de meio 57
4.4.2.1 *Ensaios e condições de experimentação* 57
4.4.2.1.1 Tratamento com cloreto férrico e carvão ativado em pó 58

4.4.2.1.2 Tratamento com sulfato férrico e carvão ativado em pó 59
4.4.2.1.3 Tratamento com cloreto férrico e carvão ativado granulado 60
4.4.2.1.4 Tratamento contínuo com carvão ativado granulado 61
4.4.2.2 *Descrição dos tratamentos* 61
4.4.2.2.1 Meio proveniente do processo em batelada alimentada 61
4.4.2.2.1.1 *Cloreto ou sulfato férrico e carvão ativado em pó* 61
4.4.2.2.1.2 *Cloreto férrico e carvão ativado granulado* 63
4.4.2.2.2 Meio proveniente de processo contínuo 63
4.4.2.3 *Cultivo de A. platensis em meios tratados* 64
4.4.2.3.1 Cultivo em meio proveniente do processo em batelada alimentada 64
4.4.2.3.1.1 *Cultivo em frascos Erlenmeyer* 64
4.4.2.3.1.2 *Cultivo em fotobiorreatores tubulares* 65
4.4.2.3.2 Cultivo em meio proveniente do processo contínuo 66
4.4.3 Técnicas analíticas 66
4.4.3.1 *Remoção de absorbância nos meios tratados* 66
4.4.3.2 *Acompanhamento do cultivo* 67
4.4.3.2.1 Concentração celular 67
4.4.3.2.2 Concentração de amônia total 67
4.4.3.2.3 Concentração de nitrato 67
4.4.3.2.4 Concentração de carbonato total 68
4.4.3.2.5 Determinação do pH 69
4.4.3.3 *Avaliação da biomassa* 69
4.4.3.3.1 Teor de proteínas 69
4.4.3.3.2 Teor de lipídeos 70
4.4.3.3.3 Teor de clorofila-a 70

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS 71
5.1 *Cálculo de parâmetros* 71
5.1.1 Remoção da A_{254} (RA_{254}) e A_{440} (RA_{440}) 71
5.1.2 Parâmetros cinéticos 72
5.2 *Análise estatística* 72
5.2.1 Meio proveniente do processo em batelada alimentada 72
5.2.2 Meio proveniente do processo contínuo 73

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 74
6.1 ***Otimizacão das condições de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado com uso de cloreto férrico e carvão ativado em pó*** 75
6.1.1 Remoção de matéria orgânica e pigmentos 75
6.1.2 Crescimento celular em meios tratados 78
6.1.3 Composição da biomassa 81
6.1.3.1 *Conteúdo de clorofila-a* 81
6.1.3.2 *Conteúdo de lipídeos e proteínas* 82
6.1.4 Análise Estatística 84
6.2 ***Otimizacão das condições de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado com uso de sulfato férrico e carvão ativado em pó*** 90
6.2.1 Remoção de matéria orgânica e pigmentos 90
6.2.2 Crescimento celular em meios tratados 91
6.2.3 Composição da biomassa 94
6.2.3.1 *Conteúdo de clorofila-a* 94
6.2.3.2 *Conteúdo de lipídeos e proteínas* 95
6.2.4. Análise Estatística 97
6.3 ***Otimizacão das condições de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado com uso de cloreto férrico e carvão ativado granulado em coluna*** 100
6.3.1 Remoção de matéria orgânica e pigmentos 100
6.3.2 Crescimento celular 101
6.3.2.1 P*arâmetros cinéticos* 101
6.3.2.2 *Composição da biomassa* 109
6.3.2.2.1 Conteúdo de clorofila-a 109
6.3.2.2.2 Conteúdo de lipídeos e proteínas 109
6.4 ***Utilização dos meios tratados em condições ótimas em fotobiorreator tubular*** 112
6.4.1 Crescimento celular em fotobiorreator tubular 112
6.4.2 Composição de biomassa obtida em fotobiorreator tubular 113
6.5 ***Tratamento contínuo de meio com carvão ativado granulado e simultâneo uso do meio tratado em processo contínuo de cultivo*** 115

6.5.1 Cultivo contínuo com meio fresco 115
6.5.2 Remoção de matéria orgânica e pigmentos 117
6.5.3 Cultivo contínuo usando diferentes proporções de meio tratado 120
6.5.4 Avaliação de biomassa 122
6.5.4.1 *Conteúdo de lipídeos* 122
6.5.4.2 *Conteúdo de proteínas* 123

7 CONCLUSÕES 126

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 128

ANEXO A – Lista de manuscritos 143

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* UTEX 1926. 28

Figura 02 – Opções de locação do *CAG* no tratamento de água (BRADY, 1997). 41

Figura 03 – Pontos de aplicação do *CAP* no tratamento: A. na tomada de água, no inicio da adutora de água bruta, B. na chegada de água bruta da estação, C. na unidade de mistura rápida e D. na entrada dos filtros (SNOEYINK, 1990). 43

Figura 04 – Diagrama esquemático de cultivo contínuo de *A. platensis* com meio tratado. 64

Figura 05 – Fotobiorreatores tubulares utilizados nos experimentos contínuos. 66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados. $CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$: Confirmação da Otimização (*CAP* = 24,4 mg L^{-1}, *F* = 20,3 mg L^{-1}, *T* = 30,4 min) (—), $CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$: Meio padrão (·····), $CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$: Meio exaurido sem tratamento (---), barras de erro correspondem ao desvio padrão. 79

Gráfico 02 – Concentração celular (■) e valores de pH (◊) no experimento de Confirmação da Otimização, $CAPF_{20}$ (*CAP* = 24,4 mg L^{-1}, *F* = 20,3 mg L^{-1}, *T* = 30,4 min). 80

Gráfico 03 – Superfície de resposta de A. RA_{254}, B. RA_{440}, C. X_m, D. P_X, E. *PTN*, e F. *Chl* em função dos valores codificados de quantidades de carvão ativado em pó (X_1) e cloreto férrico (X_2) considerando o tempo de contato (X_3) no nível central do planejamento (*T* = 30,0 min). 87

Gráfico 04 – Concentração celular máxima (X_m) em função de Remoção de A_{254} (RA_{254}, ♦) e Remoção de A_{440} (RA_{440}, ■). 88

Gráfico 05 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados. $CAPS_{20}$-$CAPS_{22}$: Confirmação da Otimização (*CAP* = 40,0 mg L^{-1}, *S* = 32,8 mg L^{-1}, *T* = 36,1 min) (—); $CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$: Meio padrão (·····); $CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$: Meio exaurido sem tratamento (---), barras de erro correspondem ao desvio padrão. 94

Gráfico 06 – Superfície de resposta de A. RA_{254}, B. RA_{440}, C. X_m, D. P_X, E. *Chl*, F. P_{Chl} e G. *PTN* em função dos valores codificados de quantidades de sulfato férrico (X_2) e tempo de contato (X_3) considerando a quantidade de carvão ativado em pó (X_1) no nível central do planejamento (*CAP* = 40,0 mg L^{-1}). 99

Gráfico 07 – Superfícies de resposta de: A. RA_{254}, B. RA_{440} e gráficos de contorno de C. RA_{254} e D. RA_{440} em função dos valores codificados de quantidades de carvão ativado granulado (X_1) e cloreto férrico (X_2) considerando o tempo de residência (X_3) no nível central do planejamento (*T* = 30,0 min). 105

Gráfico 08 – Cultivo de *A. platensis* em frascos Erlenmeyers sob diferentes condições de tratamento. $CAGF_{15}$-$CAGF_{19}$: Testes do ponto central do desenho experimental (*CAG* = 100,0 g, *F* = 10,0 mg L^{-1}, *T* = 30,0 min (•), $CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$: Confirmação da otimização (*CAG* = 108,4 g, *F* = 10,0 mg L^{-1}, *T* = 30,8 min (■), $CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$: Meio padrão (---), $CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$: Meio reaproveitado sem tratamento (·····), barras de erro correspondem ao desvio padrão. 107

Gráfico 09 – Superfície de resposta de A. X_m, B. P_X, C. *Chl*, D. P_{Chl} e E. *PTN* em função dos valores codificados de quantidades de carvão ativado granulado (X_1) e tempo de residência (X_3) considerando a quantidade de cloreto férrico (X_2) no nível central do planejamento (*F* = 10,0 mg L^{-1}). 108

Gráfico 10 – Crescimento celular durante o cultivo de *A. platensis* em meios tratados usando FBR tubulares. Meio tratado com *CAP* e *F* (– –), Meio tratado com *CAP* e *S* (– · ·), Meio tratado com *CAG* e *F* (----), Meio padrão (——), barras de erro correspondem ao desvio padrão. 114

Gráfico 11 – Concentração celular em função do tempo de cultivo contínuo de *A. platensis* utilizando diferentes proporções de meio tratado, sem adição, C_b, ou com adição, C_c, de ureia. Cada uma dessas condições foi precedida por uma etapa de cultivo descontínuo alimentado (0 a 5 dias) e uma etapa de processo contínuo onde se utilizou apenas meio fresco (5 a 10 dias) (C_a). 116

Gráfico 12 – Conteúdo total de proteínas (*PTN*) em função do tempo de cultivo utilizando diferentes proporções de meio tratado. 125

LISTA DE QUADROS

Quadro 01 –	Parâmetros estabelecidos pela norma EB-2133 para o fornecimento de carvão ativado em pó, utilizado na adsorção de impurezas no tratamento de água para abastecimento público.	44
Quadro 02 –	Métodos mecânicos de separação de microalgas.	51
Quadro 03 –	Composição do meio de cultivo de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982).	55
Quadro 04 –	Planejamento experimental fatorial de tratamento com carvão ativado em pó (*CAP*) e cloreto férrico (*F*).	58
Quadro 05 –	Planejamento experimental fatorial de tratamento com carvão ativado em pó (*CAP*) e sulfato férrico (*S*).	59
Quadro 06 –	Planejamento experimental fatorial de tratamento com carvão ativado granulado (*CAG*) e cloreto férrico (*F*).	60
Quadro 07 –	Experimentos de tratamento contínuo com carvão ativado granulado (*CAG*) em FBR tubulares.	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados com carvão ativado em pó e cloreto férrico segundo planejamento experimental. 76

Tabela 02 – Teor de clorofila em cultivos de *A. platensis* utilizando diferentes FBR. 82

Tabela 03 – Coeficientes de correlação estimados pela Equação 08 na predição dos parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl*, *PTN* e P_X. 85

Tabela 04 – Comparação dos valores experimentais das variáveis dependentes (RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl*, *PTN* e P_X) e seus correspondentes valores estimados por regressão multivariável. 89

Tabela 05 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados com carvão ativado em pó e sulfato férrico segundo planejamento experimental. 92

Tabela 06 – Coeficientes de correlação estimados pela Equação 08 na predição dos parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, P_X, *Chl*, P_{Chl} e *PTN*. 98

Tabela 07 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados com carvão ativado granulado e cloreto férrico segundo planejamento experimental, utilizando frascos Erlenmeyer. 102

Tabela 08 – Coeficientes de correlação estimados pela Equação 08 na predição dos parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl*, *PTN*, P_X e P_{Chl}. 104

Tabela 09 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados utilizando FBR tubulares. 113

Tabela 10 – Resultados experimentais de cultivo contínuo de *A. platensis* em estado estacionário usando meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia (C_a) e vazão específica de alimentação (D) de 0,6 d^{-1}. 117

Tabela 11 – Remocão de absorbância 254 nm (RA_{254}) e 440 nm (RA_{440}) com carvão ativado granulado no cultivo contínuo de *A. platensis* sem (C_b) e com (C_c) adição de ureia no meio tratado. 118

Tabela 12 – Resultados de cultivo contínuo de *A. platensis* sem (C_b) e com (C_c) adição de ureia no meio tratado. 119

Tabela 13 – Média de RA_{254}, RA_{440}, X_S e *PTN* obtidos por MANOVA para o cultivo contínuo de *A. platensis* sem (C_b) e com (C_c) adição da concentração de ureia no meio tratado. 120

Tabela 14 – Média de RA_{254} e RA_{440} obtidos por MANOVA para o cultivo contínuo de *A. platensis* usando quatro proporções de meio tratado (25, 50, 75 e 90 %). 120

Tabela 15 – Média de X_S e *PTN* obtidos por MANOVA para o cultivo de *A. platensis* usando quatro proporções de meio tratado (25, 50, 75 e 90 %). 123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	Association of Analytical Communities
C_a	primeira condição de estado estacionário
C_b	segunda condição de estado estacionário
C_c	terceira condição de estado estacionário
COD	carbono orgânico dissolvido
COT	carbono orgânico total
DBO	demanda bioquímica de oxigênio
DQO	demanda química de oxigênio
EC	experimento de cultivo contínuo
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPS	exapolisacarídeos
FAO	(do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*) Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FBR	fotobiorreator ou fotobiorreatores
lag	fase de adaptação do crescimento microbiano
MO	matéria orgânica
MSR	metodologia superfície de resposta
psi	(do inglês *pound force per square inch*) libra força por polegada quadrada
SCP	(do inglês *single cell protein*) proteína obtida a partir de micro-organismos
sp.	(do latim *specie*) espécie
spp.	(do latim *species*) espécies
U.S.	(do inglês *United States*) Estados Unidos de América
UTEX	(do inglês *University of Texas*) Universidade do Texas

LISTA DE SÍMBOLOS

A_{254}	absorbância 254 nm (cm^{-1})
$A254_{BT}$	absorbância 254 nm antes do tratamento (cm^{-1})
$A254_{AT}$	absorbância 254 nm após do tratamento (cm^{-1})
$A254_{Mis}$	absorbância 254 nm do meio misto (cm^{-1})
A_{440}	absorbância 440 nm (cm^{-1})
$A440_{BT}$	absorbância at 440 nm antes do tratamento (cm^{-1})
$A440_{AT}$	absorbância at 440 nm após do tratamento (cm^{-1})
$A440_{Mis}$	absorbância at 440 nm do meio misto (cm^{-1})
C	Custo de meio de cultivo (R$ m^{-3})
CAP	carvão ativado em pó (mg L^{-1})
CAG	carvão ativado granulado (g)
Chl	conteúdo de clorofila-a na biomassa seca (mg g^{-1})
Chl-a	concentração de clorofila-a na suspensão celular (mg L^{-1})
D	vazão específica de alimentação (d^{-1})
F	cloreto férrico (mg L^{-1})
LIP	conteúdo total de lipídeos na biomassa seca (%)
P	nível descritivo correspondente ao erro
p	proporção de meio tratado (%)
P_{Chl}	produtividade de clorofila-a (mg L^{-1} d^{-1})
pH	potencial hidrogeniônico
PTN	conteúdo total de proteínas na biomassa seca (%)
P_X	produtividade celular (mg L^{-1} d^{-1})
RA_{254}	remoção de absorbância em comprimento de onda 254 nm (%)
RA_{440}	remoção de absorbância em comprimento de onda 440 nm (%)

R$	moeda brasileira, Real
R^2	coeficiente de correlação
S	sulfato férrico (mg L^{-1})
T	tempo de contato ou residência (min)
T_c	tempo de cultivo (d)
US$	moeda norte-americana, Dólar americano
X	concentração celular (mg L^{-1})
X_1	valor codificado da variável *CAP* ou *CAG*
X_2	valor codificado da variável *F* ou *S*
X_3	valor codificado da variável *T*
X_o	concentração celular inicial em base seca (mg L^{-1})
X_m	concentração celular máxima em base seca (mg L^{-1})
X_s	concentração celular no estado estacionário (mg L^{-1})
X_{Sa}	concentração celular no primeiro estado estacionário (mg L^{-1})
X_{Sb}	concentração celular no segundo estado estacionário (mg L^{-1})
X_{Sc}	concentração celular no terceiro estado estacionário (mg L^{-1})
Y_i	variáveis resposta

RESUMO

MOROCHO-JÁCOME, A. L. **Estudo do reaproveitamento de meio no cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis***. 2014. 143 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Arthrosphira (Spirulina) platensis apresenta substâncias de interesse nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. A produção industrial envolve uma quantidade muito grande de água e sua viabilidade deve contemplar o reuso do meio, visando uma diminuição de custos com nutrientes, bem como da poluição ambiental, tornando-se assim um processo sustentável. O presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação do reaproveitamento do meio no cultivo de *A. platensis* usando tratamentos físico-químicos de floculação e adsorção. Para tanto, tal cianobactéria foi cultivada em fotobiorreator (FBR) tubular em processos de batelada alimentada e contínuo em intensidade luminosa de 120 µmol fótons m^{-2} s^{-1}, sob controle de pH. Foram desenvolvidas técnicas de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado de *A. platensis* para a remoção de matéria orgânica (MO) e pigmentos (60 – 96 %), permitindo assim seu reuso em novos cultivos. *A. platensis* foi cultivada nos meios tratados utilizando frascos Erlenmeyer, com avaliação de parâmetros como concentração celular máxima (X_m), conteúdo de clorofila-a (*Chl*) e conteúdo de proteína na biomassa seca (*PTN*). No processo simultâneo de floculação e adsorção com carvão ativado em pó (*CAP*), foram testados dois agentes floculantes, cloreto férrico (*F*) e sulfato férrico (*S*), bem como diferentes tempos de contato. No processo simultâneo de floculação com *F* e adsorção com *CAP*, as condições ótimas foram: *CAP* = 24,4 mg L^{-1} e *F* = 20,3 mg L^{-1} durante 30,4 min de tempo de contato; com obtenção de: X_m = 4893 ± 33 mg L^{-1}, *Chl* = 24,3 ± 0,1 mg g^{-1}, *PTN* = 36,1 ± 0,6 %. As condições ótimas de tratamento simultâneo de floculação com *S* e adsorção com *CAP* foram: *CAP* = 40,0 mg L^{-1} e *S* = 32,8 mg L^{-1} durante 36,1 min de tempo de contato, com obtenção de: X_m = 4863 ± 64 mg L^{-1}, *Chl* = 24,5 ± 0,6 mg g^{-1}, *PTN* = 60,1 ± 0,6 %. No processo sequencial de floculação com *F* seguido de adsorção com carvão ativado granulado (*CAG*), as condições ótimas foram atingidas com: *CAG* = 108,4 g e *F* = 10,0 mg L^{-1} durante 30,8 min de tempo de residência; obtendo-se: X_m = 3140 ± 77 mg L^{-1}, *Chl* = 35,4 ± 0,2 mg g^{-1}, *PTN* = 44,9 ± 0,0 %. Adicionalmente, os meios tratados nessas condições ótimas de cada tratamento, também foram testados em FBR tubulares, atingindo valores de X_m, *Chl* e *PTN* maiores do que os obtidos com meio padrão. Além disso, o processo simultâneo de cultivo celular em FBR tubulares e adsorção contínua do meio de cultivo exaurido em coluna de *CAG* removeu 51 – 79 % de MO e pigmentos. Foi demonstrado que uma proporção de 75 % de meio tratado no meio de alimentação não produz diminuição significativa de produtividade celular (P_X) e os resultados foram: concentração celular em estado estacionário (X_s) de 1568 ± 15 mg L^{-1}, P_X = 941 mg L^{-1} d^{-1}, *PTN* = 42,0 ± 0,6 %, com diminuição de 65 % no custo de meio de cultivo. Por fim, conclui-se que é viável a utilização de processos físico-químicos no tratamento de meio a ser reaproveitado no cultivo de *A. platensis*, inclusive em FBR tubulares, com apreciável incremento de clorofila-a e proteínas na biomassa obtida em meio tratado.

Palavras-chave: *Arthrosphira* (*Spirulina*) *platensis*. Reaproveitamento de meio. Adsorção. Floculação. Biomassa.

ABSTRACT

MOROCHO-JÁCOME, A. L. **Study of reuse of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation medium.** 2014. 143 p. Doctor Thesis – Pharmaceutical Sciences College, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

Arthrospira (Spirulina) platensis have compounds of interest in the food, pharmaceutical and cosmetic industries. Industrial production involves high volumes of water and its viability should contemplate medium reuse, aiming to reduce not only nutrient costs, but also environmental pollution, thus becoming a sustainable process. This work had as main objective the evaluation of *A. platensis* culture medium reuse through the physicochemical treatments flocculation and adsorption. Thus, this cyanobacterium was cultivated in tubular photobioreactor (PBR) by fed-batch and continuous processes at light intensity 120 µmol photons m^{-2} s^{-1} under pH control. Treatment techniques were developed for culture medium from fed-batch process to properly removal of organic matter (OM) and pigments (60 – 96 %), thus allowing its reuse in new cultures. *A. platensis* was cultivated in treated medium using Erlenmeyer flasks, with the evaluation of parameters such as maximum cell concentration (X_m), chlorophyll content (*Chl*) and protein content in dry biomass (*PTN*). For simultaneous flocculation and adsorption with powdered activated carbon (*PAC*), two flocculants were used: ferric chloride (*F*) and ferric sulfate (*S*), as well as different contact times. In the simultaneous process of *F* flocculation and *PAC* adsorption, optimum conditions were: *PAC* = 24.4 mg L^{-1} and *F* = 20.3 mg L^{-1} for 30.4 min contact time; results were: X_m = 4893 ± 33 mg L^{-1}, *Chl* = 24.3 ± 0.1 mg g^{-1}, *PTN* = 36.1 ± 0.6 %. Optimal conditions in the simultaneous process of *S* flocculation and *PAC* adsorption were: *PAC* = 40.0 mg L^{-1} and *S* = 32.8 mg L^{-1} for 36.1 min contact time; results were: X_m = 4863 ± 64 mg L^{-1}, *Chl* = 24.5 ± 0.6 mg g^{-1}, *PTN* = 60.1 ± 0.6 %. In the sequential process of *F* flocculation followed by adsorption with granular activated carbon (*GAC*), optimal conditions were reached at *GAC* = 108.4 g and *F* = 10.0 mg L^{-1} for 30.8 min of residence time, at which X_m = 3140 ± 77 mg L^{-1}, *Chl* = 35.4 ± 0.2 mg g^{-1} and *PTN* = 44.9 ± 0.0 % were obtained. Moreover, medium treated at each optimal condition were also tested in tubular PBRs, reaching values of X_m, *Chl* and *PTN* higher than those obtained with standard medium. Furthermore, the simultaneous process of cell cultivation in tubular PBR and continuous adsorption of spent cultivation medium through *GAC* column removed 51 – 79 % of OM and pigments. It was showed that 75 % of treated medium in the feed medium does not cause significant decrease in cell productivity (P_X) and results were: steady-state cell concentration (X_s) = 1568 ± 15 mg L^{-1}, P_X = 941 mg L^{-1} d^{-1}, *PTN* = 42.0 ± 0.6 %, with 65 % reduction in medium price. At last, it can be inferred that the use of physicochemical processes in medium treatment is feasible for reuse in *A. platensis* cultivation, including that in tubular PBR, leading to considerable increase in chlorophyll and protein contents of the biomass obtained with treated medium.

Keywords: *Artrosphira (Spirulina) platensis*. Medium reuse. Adsorption. Flocculation. Biomass.

RESUMEN

MOROCHO-JÁCOME, A. L. **Estudio del reaprovechamiento del medio en el cultivo de *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis***. 2014. 143 p. Tesis (Doctorado) – Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Universidad de São Paulo, São Paulo, 2014.

Artrosphira (Spirulina) platensis presenta sustancias de interés en las industrias de alimentos, fármacos y cosméticos. La producción industrial implica una elevada cantidad de agua y su viabilidad debe contemplar el reuso del medio provocando una disminución de costos con nutrientes y contaminación ambiental, convirtiéndose así en un proceso sustentable. El presente estudio tuvo como objetivo principal evaluar el reuso del medio en el cultivo de *A. platensis* mediante tratamientos físico-químicos de floculación y adsorción. Por tanto, esta cianobacteria fue cultivada en fotobiorreactor (FBR) tubular en procesos por lote alimentado y contínuo con intensidad de luz de 120 µmol fotones m^{-2} s^{-1} con control de pH. Fueron desarrolladas técnicas de tratamiento de medio de cultivo proveniente del proceso por lote alimentado que permitieron la remoción apropiada de materia orgánica (MO) y pigmentos (60 – 96 %), permitiendo así su reuso en nuevos cultivos. *A. platensis* se cultivó en medios tratados usando matraces Erlenmeyer, con la evaluación de parámetros tales como la concentración celular máxima (X_m), contenido de clorofila-a (*Chl*) y contenido de proteína en la biomasa seca (*PTN*). En el proceso simultáneo de floculación y adsorción con carbón activado en polvo (*CAP*), se probaron dos agentes floculantes, cloreto férrico (*F*) y sulfato férrico (*S*), así como diferentes tiempos de contacto. En el proceso simultáneo de floculación con *F* y adsorción con *CAP*, las condiciones óptimas fueron: *CAP* = 24,4 mg L^{-1} y *F* = 20,3 mg L^{-1} durante 30,4 min de tiempo de contacto; obteniéndose: X_m = 4893 ± 33 mg L^{-1}, *Chl* = 24,3 ± 0,1 mg g^{-1}, *PTN* = 36,1 ± 0,6 %. Las condiciones óptimas de tratamiento simultáneo de floculación con *S* y adsorción con *CAP* fueron: *CAP* = 40,0 mg L^{-1} y *S* = 32,8 mg L^{-1} durante 36,1 min de tiempo de contacto, obteniéndose: X_m = 4863 ± 64 mg L^{-1}, *Chl* = 24,5 ± 0,6 mg g^{-1}, *PTN* = 60,1 ± 0,6 %. En el proceso secuencial de floculación con *F* seguido de adsorción con carbón activado granulado (*CAG*), las condiciones óptimas se lograron con: *CAG* = 54,2 g L^{-1} y *F* = 10,0 mg L^{-1} durante 30,8 min de tiempo de residencia; obteniéndose: X_m = 3140 ± 77 mg L^{-1}, *Chl* = 35,4 ± 0,2 mg g^{-1}, *PTN* = 44,9 ± 0,0 %. Además, los medios tratados en esas condiciones óptimas de cada tratamiento, también fueron probados en FBR tubulares, alcanzando valores de X_m, *Chl* e *PTN* superiores a los obtenidos con el medio estándar. Adicionalmente, el proceso simultáneo de cultivo celular en FBR tubulares y adsorción contínua de medio agotado en columna de *CAG* removió 51 – 79 % de MO y pigmentos. Se demostró que 75 % de medio tratado en el medio de alimentación no produce una disminución significativa de la productividad celular (P_X) y los resultados fueron: concentración celular en estado estacionario (X_s) 1568 ± 15 mg L^{-1}, P_X = 941 mg L^{-1} d^{-1}, *PTN* = 42,0 ± 0,6 %, con una reducción de 65 % del costo del medio de cultivo. Finalmente, se concluye que es factible el uso de procesos fisicoquímicos en el tratamiento de medio para ser reutilizado en el cultivo de *A. platensis*, incluso en FBR tubulares, con un considerable aumento de clorofila-a y proteínas en la biomasa obtenida en medio tratado.

Palabras clave: *Artrosphira* (*Spirulina*) *platensis*. Reuso de medio. Adsorción. Floculación. Biomasa.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo de micro-organismos fotossintetizantes é um tema bastante atual que está relacionado com importantes necessidades humanas, podendo ser destacadas a produção de alimentos e remoção de gás carbônico atmosférico e/ou industrial (SPOLAORE et al., 2006).

Arthrospira (*Spirulina*) *platensis*, *Dunaliella salina* e *Chlorella vulgaris* são cultivados e comercializados para nutrição humana, principalmente. Porém a pesquisa de estas e outras cianobactérias incrementa-se rapidamente, principalmente visando à produção de biocombustíveis (CHISTI, 2007; CHISTI, 2008).

Dentre os micro-organismos mencionados, merece destaque *A. platensis* pela diversidade de propriedades desejadas da biomassa, o que induz a seu consumo como alimento humano. De fato, é destacado na literatura que a cianobactéria *Arthrospira* representa uma fonte alternativa de proteínas, pois tem alto teor protéico, podendo chegar a valores da ordem de 70 % da biomassa seca (PELIZER et al., 2003), boa digestibilidade e baixo teor de ácidos nucleicos (CIFERRI; TIBONI, 1985). Além disso, sua biomassa contém vitaminas, ácidos graxos polinsaturados, polissacarídeos com propriedade imunomodulatória, bem como pigmentos e antioxidantes (PULZ; SCHEIBENBOGEN, 1998).

A biomassa produzida pode ser utilizada como complemento alimentar para humanos, ou incorporada em alimentos e/ou rações animais e devido à tendência de utilização de corantes naturais é muito promissor seu uso como aditivo em alimentos (LEMES et al., 2012). Outras aplicações incluiriam obtenção de moléculas para possível utilização nas indústrias farmacêutica e/ou química (LI et al., 2008), contribuindo para o desenvolvimento de tecnologias a partir de fontes renováveis de energia.

Com relação às características de processo de produção em grande escala, o cultivo da *A. platensis* é facilitado, pois ela cresce em meio inorgânico altamente salino (20,57 g L^{-1}) e pH alcalino (RODRIGUES et al., 2010), representados preponderantemente pelo bicarbonato e carbonato de sódio, de forma que seria diminuído o risco de contaminação por outros micro-organismos fotossintetizantes (CARVALHO et al., 2004). Dessa forma, esses cultivos em escala industrial podem ocorrer com sucesso em fotobiorreatores (FBR) abertos e fechados, pois a remoção

da biomassa do meio de cultivo é facilitada devido a sua maior dimensão com relação as de outras microalgas e cianobactérias e também por sua característica filamentosa.

Considerando que a *A. platensis* é constituída de aproximadamente 50 % de carbono, a utilização do dióxido de carbono no cultivo desta cianobactéria pode contribuir consideravelmente para a diminuição do custo de produção, bem como a redução de emissão deste poluente (FERREIRA et al., 2012; MATSUDO et al., 2012). A biofixação deste gás pela *A. platensis* diminuiria os problemas ambientais decorrentes do aumento da quantidade deste gás na atmosfera, problemas tais como o aumento da temperatura global e a acidificação dos oceanos. Adicionalmente, *A. platensis* é um micro-organismo versátil que pode crescer mixotroficamente (LODI et al., 2005) e poderia aproveitar o carbono orgânico presente em quantidades elevadas nas águas residuárias. O nitrogênio é o segundo elemento mais abundante da célula que precisa ser adicionado ao cultivo. Embora os nitratos sejam tradicionalmente utilizados (VONSHAK,1997), outras fontes de nitrogênio de baixo custo como sais de amônio (BEZERRA et al., 2008; FERREIRA et al., 2010) e/ou ureia (MATSUDO et al., 2011; MOROCHO-JÁCOME et al., 2012; VIEIRA et al., 2012), contribuem na viabilização do cultivo deste micro-organismo (DANESI et al., 2002).

Por outro lado, o mercado de biomassa de microalgas e cianobactérias cresce a cada dia (SPOLAORE et al., 2006). Assim, a produção e o mercado de *A. platensis* têm crescido consideravelmente e, por isso, é importante propor uma metodologia para reaproveitamento do meio obtido no final dos cultivos pretendendo evitar a eutrofização, bem como a salinização do solo (USP, 2010). De fato, o volume de meio para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes envolvido nessa produção é extremamente grande (por exemplo, no cultivo de *Arthrospira platensis* em FBR abertos, o volume seria da ordem de 350 bilhões de litros), nessas condições o custo do meio com sais majoritários de grau técnico chegaria a valores da ordem de 120 bilhões de reais, ficando evidenciada a importância econômica deste trabalho.

O uso da combinação dos processos de adsorção e floculação permite a diminuição de material orgânico do meio a ser tratado, uma vez que a coagulação utilizando diferentes agentes químicos permite a formação de agregados de material orgânico maiores e facilita a sua posterior adsorção no carvão ativado a ser

empregado (USP, 2010). Esses processos, combinados com processos de filtração, podem facilitar a remoção de materiais orgânicos do meio de cultivo, diminuindo sua turbidez e facilitando o reaproveitamento do mesmo em novos cultivos.

Dentro desse contexto, este trabalho pretende avaliar diversos tratamentos físico-químicos do meio exaurido do cultivo de *A. platensis* em FBR tubulares com a finalidade de reuso do mesmo em novos cultivos de *A. platensis* visando a sua aplicação, principalmente, no preparo de rações animais ou como matéria-prima para obtenção de compostos com atividade biológica e corantes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Cianobactérias são bactérias fotossintetizantes que requerem apenas nutrientes inorgânicos, água e luz para seu crescimento caracterizado por altas velocidades (CHRONAKIS et al., 2000) quando comparados com células vegetais.

A produção de proteínas de micro-organismos é uma via alternativa de disponibilidade de fonte protéica para alimentação. Esse tipo de proteína é conhecido como proteína unicelular (*single cell protein* – SCP), obtida de leveduras e bactérias, particularmente das cianobactérias (LITCHFIELD, 1977).

Tacon e Jackson (1985) enumeraram as seguintes vantagens das cianobactérias como fonte protéica alternativa: a) são capazes de utilizar fontes de carbono inorgânico e orgânico, b) possuem em torno de 40 – 70 % de proteína bruta em função da espécie, c) apresentam tempos de geração curtos sob condições ótimas de crescimento, d) são facilmente cultivadas em pequenas áreas, e) permitem possíveis manipulações genéticas para alteração de sua composição.

Existem fatores ambientais que influenciam no crescimento de cianobactérias como temperatura, pH, suplemento de luz e CO_2. Mesmo assim, a concentração de nitrogênio também é um fator determinante no cultivo, uma vez que este nutriente é utilizado, principalmente, para constituir proteínas e ácidos nucléicos, fundamentais para a manutenção e crescimento celular (WATANABE; HALL, 1996).

Sabe-se que as cianobactérias são um dos grupos de produtores primários dos ambientes aquáticos e pela versatilidade de fixar nitrogênio e carbono ao mesmo tempo, tem sido proposto o seu uso para a atividade de sequestro de carbono principalmente no oceano (CAPONE, 2001).

Por outro lado, no mundo atual, as atividades da civilização liberam o elemento fósforo para o ambiente aquático, que apesar de essencial a todos os seres vivos, antigamente era escasso na natureza. Sendo a eutrofização, um fenômeno produzido pelo excesso de nutrientes (principalmente fósforo ou nitrogênio) que promove uma proliferação excessiva de flora oportunista, a melhor competitividade de cianobactérias faz delas um dos micro-organismos mais envolvidos na eutrofização (CAPONE, 2001).

2.1 *Arthrospira sp.*

A cianobactéria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* (Figura 01) vem sendo cultivada fotoautotroficamente para a produção de biomassa com alto conteúdo protéico, da ordem de 70 % em massa seca (PELIZER et al., 2003), colocando-se acima das carnes e da soja (DILLON; PHUC; DUBACQ, 1995; STANCA; POPOVIC, 1996). Apresenta a vantagem de não conter o colesterol das carnes, é pouco calórica, além de conter todos os aminoácidos essenciais recomendados pela FAO. Sua biomassa é caracterizada pela boa digestibilidade e por possuir baixo teor de ácidos nucléicos, não ultrapassando 5 % da massa seca (DURAND-CHASTEL,1980). Adicionalmente, tem em sua constituição vitaminas A, E, K, B e C (BECKER, 1981), ácidos graxos poliinsaturados (MAHAJAN; KAMAT, 1995), bem como polissacarídeos com propriedade imunomodulatória, pigmentos e antioxidantes (PULZ; SCHEIBENBOGEN, 1998).

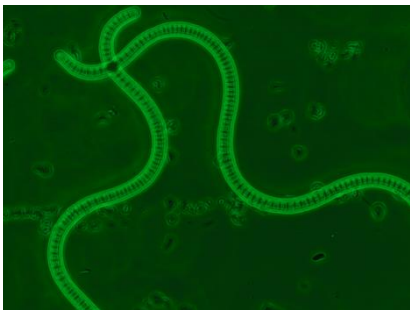

Figura 01 – *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* UTEX 1926.

A *Arthrospira* cresce em meios líquidos específicos ricos em sais minerais, compostos principalmente por bicarbonato e carbonato de sódio, com pH de 8 a 11. As regiões propícias são as tropicais e subtropicais quentes e ensolaradas. Isoladas no México, Tchad, Etiopia, Quênia, Zaire, Zâmbia, etc., as espécies do gênero *Arthrospira* constituem um dos raros exemplos de cianobactérias continentais utilizadas naturalmente como alimento humano e animal (ABDIN EL SHERIF; CLEMENT, 1982). Particularmente, no Brasil há relato do isolamento de *A. platensis* CCIBt3335, proveniente das lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, região situada no Estado de Mato Grosso do Sul, que apresentam valores de pH na faixa de 9 a 11 (SANTOS, 2013).

2.1.1 Classificação e morfologia

Arthrospira, pertencente à ordem *Oscillatoriales,* classe *Cyanophyceae*, é uma cianobactéria filamentosa, de cor verde azulada, caracterizada por uma cadeia de células cilíndricas dispostas de forma helicoidal – denominados tricomas (GUGLIELMI; RIPPKA; TANDEAU DE MARSAC, 1993), que variam de tamanho e morfologia conforme as condições de crescimento; possuem geralmente cerca de 500 µm de comprimento e de 6 a 12 µm de diâmetro (TOMASELLI, 1997).

Existe discordância entre diversos autores em relação à denominação desta cianobactéria. As espécies pertencem ao gênero *Arthrospira*, que foi oficialmente incluído no *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (CASTENHOLZ, 1989) no ano de 1989, e que foi diferenciado do gênero *Spirulina* com base em diversas características morfológicas e genéticas (TOMASELLI, 1997).

2.1.2 Condições de cultivo

Quanto aos aspectos tecnológicos de cultivo da *Arthrospira*, esta apresenta vantagens em relação aos demais fotoautotróficos. Dentre estas, podem ser citadas o crescimento em pH alcalino e altamente salino, fatores importantes na prevenção de contaminação no FBR por micro-organismos estranhos (BOROWITZKA, 1999) e a separação fácil do meio de cultivo, devido à forma espiralada e maiores dimensões (RICHMOND, 1988; PIORRECK et al., 1984). Desenvolve-se em meios em que os constituintes principais são as fontes minerais de carbono (carbonatos, bicarbonatos), fósforo e nitrogênio (normalmente, nitratos) e cresce bem em temperaturas da ordem de 30 °C (VONSHAK, 1997).

2.1.2.1 *Fonte de nitrogênio*

Sabe-se que a quantidade e qualidade da fonte de nitrogênio usada no meio de cultivo podem influenciar no conteúdo de proteína, bem como em outros constituintes da *Arthrospira sp.*, tais como lipídeos e suas frações e pigmentos (BOUSSIBA; RICHMOND, 1980; PIORRECK et al., 1984; NAES; POST, 1988; STANCA; POPOVIC, 1996; DANESI et al., 2002; DANESI et al., 2004). Neste sentido, muitos trabalhos foram realizados visando à utilização de diversas fontes de

nitrogênio para o cultivo de *A. platensis*. Os melhores resultados foram atribuídos aos nitratos em termos de biomassa produzida (CORNET; DUSSAP; GROS, 1998), o que confirma a ampla utilização dos meios de Paoletti (PAOLETTI; PUSHPARAJ; TOMASELLI, 1975) e Zarrouk (STANCA; POPOVIC, 1996), que utilizam KNO_3 e $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio, respectivamente.

Faintuch (1989), estudando diferentes fontes de nitrogênio para cultivo de *Arthrospira maxima* por processo descontínuo, verificou que a utilização de fontes alternativas de nitrogênio em vez de nitrato, como cloreto de amônio e ureia, só foram viáveis com reduzidos níveis de concentração do nutriente, com consequente diminuição da quantidade de biomassa produzida.

Saxena, Ahmad e Shyam (1983), trabalhando com produção de *A. platensis* a partir de águas residuárias domésticas adicionadas de sais, conseguiram bons resultados com ureia a 0,01 % como complementação, embora os teores proteicos maiores tenham sido obtidos para a fonte nitrato de sódio 0,1 %. Isso poderia ser esperado em função do planejamento executado, que levou ao fornecimento de 3,53 vezes mais nitrogênio (considerando o número de átomos) na complementação realizada com nitrato.

Mesmo assim, há estudos indicando que durante depleção de nitrato o crescimento para e apoproteínas e ficocianinas são degradadas para suprir as necessidades de nitrogênio (CORNET; DUSSAP; GROS, 1998), o que poderia ser estendido para outras fontes, uma vez que o nitrogênio incorporado nos aminoácidos é o amoniacal.

Segundo Danesi et al. (2002), uma vantagem da ureia em relação aos nitratos é que fornece dois átomos de nitrogênio. Além disso, a ureia como fonte de nitrogênio provê um ganho energético pela formação de amônia por ação da urease ou sua hidrólise espontânea em meio alcalino de modo que o nitrogênio amoniacal é assimilado pela *Spirulina*. O cultivo de *Spirulina spp.* utilizando ureia obteve um aumento de 37 % na produção de biomassa e menor custo quando foi comparado com os cultivos realizados com KNO_3.

Por outro lado, na *A. platensis*, a deficiência de nitrogênio durante o período de crescimento leva a um decréscimo na produção de ficocianina e clorofila, e também a composição de ácidos graxos pode ser afetada (FUNTEU et al., 1997).

Segundo Cornet, Dussap e Gros (1998), com a adição de fonte de nitrogênio em cultivos deficientes em nitrogênio ocorre um rápido aumento na quantidade de

proteínas, tais como ficocianinas e, com menos intensidade, são produzidas outras proteínas celulares.

Particularmente no caso do uso de fontes de nitrogênio amoniacais no cultivo de *A. platensis*, o controle da vazão de alimentação pode permitir que se evitasse o trabalho em concentrações inibitórias de amônia no meio de cultivo (CARVALHO et. al., 2004; SOLETTO et al., 2005; BEZERRA et al., 2008).

Ferreira et al. (2010) cultivando *A. platensis* em FBR tubular, determinaram experimentalmente que as vazões de alimentação de sulfato de amônio que dariam sustentação adequada ao crescimento celular seriam as parabólicas.

Inclusive, foi testado o uso de CO_2 proveniente de fermentação alcoólica no crescimento de *A. platensis* em FBR tubular com associação de nitrato de sódio e sulfato de amônio como fontes de nitrogênio (FERREIRA et al., 2012).

Em trabalho recente, foi testado o uso de outras associações de fontes de nitrogênio como ureia e nitrato de potássio em FBR abertos (VIEIRA et al., 2012).

Finalmente, o uso de ureia como fonte de nitrogênio não leva a fase lag no crescimento de *A. platensis*. (SANCHEZ-LUNA et al., 2007, MOROCHO-JÁCOME et al., 2012).

2.1.2.2 *pH*

O meio padrão para *Arthrospira* (SCHLÖSSER, 1982) é rico em bicarbonato e carbonato. Este meio é alcalino devido à presença destes íons. A forma de carbono preferencialmente assimilada por cianobactérias é o bicarbonato, sendo o pH ideal de cultivo aquele que assegure o maior deslocamento do equilíbrio químico no sentido de sua formação.

Particularmente em cultivo com fonte de nitrogênio que leva à formação de amônia no meio de cultivo, o pH também determina a forma em que esta substância se apresenta no meio. Em pH abaixo de 8,0 há uma predominância de íon amônio. Em pH acima de 11,0, o nitrogênio encontra-se na forma não protonada de amônia que é a forma que tem passagem livre pela membrana celular (BELKIN; BOUSSIBA, 1991).

A assimilação fotossintética do carbono é realizada pela passagem ativa de bicarbonato do meio de cultivo para o interior das células, onde no sistema fotossintético ocorre a captura do anidrido carbônico com consequente liberação do

carbonato remanescente (FERRAZ, 1986). Assim, com o crescimento celular tem-se um aumento do valor de pH, pelo acúmulo de carbonato no meio. Por isso, para o controle do pH, é necessária a manutenção da relação bicarbonato/carbonato que assegure o pH desejado. Isso pode ser feito pelo borbulhamento de anidrido carbônico (CO_2) ou pode-se restabelecer o pH por acréscimo de ácido mineral, deslocando o equilíbrio no sentido de formação de bicarbonato.

2.1.2.3 *Temperatura*

O efeito da temperatura no cultivo é explicado como se fossem dois fatores: ação da temperatura na estrutura dos componentes celulares (proteínas e lipídeos) e relação dos coeficientes de temperatura com a taxa de reação; esses coeficientes dependem das energias de ativação das reações (FAINTUCH,1989).

A temperatura mínima permitida para o crescimento de *Arthrospira spp.* é de 18 ^{o}C (JIMÉNEZ et al., 2003). No entanto, a temperatura de 29 ^{o}C foi considerada como a melhor para a produtividade celular (SANCHEZ-LUNA et al., 2007).

A temperatura tem influência importante na produção de biomassa, proteínas, lipídeos e compostos fenólicos no cultivo de *A. platensis*. De fato, a 35 °C ocorre um efeito negativo na produção de biomassa, mas tem um efeito positivo na produção de proteína, lipídeos e compostos fenólicos.

Segundo Colla et al. (2005) foram obtidas densidade de biomassa e produtividade altas aos 30 °C, embora a concentração de nitrogênio parecia não ter nenhum efeito na quantidade de proteína, lipídeos ou compostos fenólicos produzidos.

Embora Rafiqul, Jalal e Alam (2005) reportaram que as condições ótimas na produção de biomassa em frascos Erlenmeyer para *A. platensis* são 32 ^{o}C e pH de 9,0, e Abu, Ogbonda e Aminigo (2007) obtiveram que as condições ótimas de crescimento de *A. platensis* são 30 ^{o}C e pH de 9,0 em frascos Erlenmeyer, neste trabalho foi considerada uma temperatura de 32 ^{o}C e pH de 9,5 para conseguir uma maior produtividade celular em FBR tubular (MOROCHO-JÁCOME et al., 2012).

2.1.2.4 *Luz*

Atendidas as necessidades de nutrientes, de forma que estes não limitem o crescimento, fatores ambientais são extremamente importantes no crescimento microalgal, influenciando na produtividade e na composição química da *Spirulina sp.* (OLGUÍN et al., 1997). Dentre estes fatores, sem dúvida, merece destaque a intensidade luminosa a que o cultivo é submetido.

A intensidade e a duração da irradiação luminosa determinam a velocidade de crescimento e o rendimento da produção, limitados, entretanto, por mecanismos enzimáticos do micro-organismo. Este limite é denominado ponto de saturação luminosa, sendo, segundo Balloni et al. (1980), da ordem de 5 a 10 klux.

Por outro lado, Vonshak et al. (1983) mostraram que o período em que a célula está na superfície do meio durante o dia influência tanto na velocidade de crescimento como na eficiência fotossintética, sendo afetado pela intensidade de agitação do FBR, pela turbulência e pela densidade populacional (RICHMOND, 1988).

Em condições de baixa intensidade luminosa, a velocidade de crescimento é diminuída, com consequente diminuição na produção de biomassa (BALLONI et al., 1980). No entanto, a iluminação muito forte dos cultivos de algas gera dois efeitos principais: fotoinibição, que leva a um decréscimo no rendimento máximo do crescimento e fotoxidação, que tem efeitos letais nas células, podendo levar à perda total da cultura (JENSEN; KNUTSEN, 1993).

A fotoinibição ocorre com o aumento da intensidade luminosa acima do nível de saturação da taxa fotossintética. Entretanto, este fenômeno também pode ocorrer sob intensidades luminosas moderadas se a taxa fotossintética estiver limitada por fatores estressantes (baixas temperaturas, etc.) (SAMUELSON et al., 1985).

Ademais, a intensidade luminosa exerce influência marcante nos parâmetros de crescimento celular, como fator de conversão de nitrogênio em células e produtividade celular, bem como na composição da biomassa. Altos valores de intensidades luminosas favorecem os parâmetros de crescimento, enquanto que valores mais baixos (da ordem de 2 klux) favorecem a obtenção de biomassa rica em clorofila (DANESI et al., 2004). Também se encontraram informações que as condições de iluminação do cultivo afetam a fração lipídica da biomassa (MAHAJAN; KAMAT, 1995).

2.1.3 Propriedades

As proteínas representam até 74 % da massa seca de *Arthrospira*, valor que varia conforme a espécie e as condições de crescimento (COHEN, 1997). Entre as proteínas estão presentes as ficocianinas, biliproteínas envolvidas nas reações bioquímicas de fotossíntese. Particularmente, os grânulos de cianoficina poderiam funcionar como principal reservatório de nitrogênio (BALLONI et al., 1980; CIFERRI, 1983).

Segundo Dillon, Phuc e Dubacq (1995), esta cianobactéria representa uma das mais ricas fontes de proteínas, e seu conteúdo é superior ao de carnes e peixes (15 a 25 %) e também ao da soja (35 %). Os autores afirmam que até 47 % da proteína presente equivalem a aminoácidos essenciais, com a presença inclusive de metionina, aminoácido ausente na maioria das cianobactérias e algas.

Os ácidos graxos presentes nesta cianobactéria são, principalmente, os ácidos palmítico, linoléico, oléico e, especialmente, os ácidos essenciais α-linolênico e γ-linolênico, correspondendo estes últimos a até 30 % de todos os ácidos graxos presentes (MAHAJAN; KAMAT, 1995). *Arthrospira* é única por conter a maior concentração de ácido γ -linolênico encontrada em organismos vegetais: 1 % da massa seca (DILLON; PHUC; DUBACQ, 1995). O teor de ácidos presentes varia conforme a espécie ou subespécie de cianobactéria (HONGSTHONG et al., 2007) e conforme as condições de crescimento, principalmente ao que diz respeito à fonte de nitrogênio (PIORRECK et al., 1984).

Dentre os pigmentos presentes em *Arthrospira*, destacam-se os carotenóides (ANNAPURNA; DEOSTHALE; BAMJI, 1991), especialmente β-caroteno (CARERI et al., 2001); e a clorofila (RANGEL-YAGUI et al., 2004), encontrados, respectivamente, em teores de até 0,4 % e 1,5 % na biomassa seca (CIFERRI, 1983). Recentemente, maior atenção vem sendo dada à *Arthrospira* pelo potencial de coloração de seus pigmentos de interesse às indústrias de alimentos, farmacêuticas e de cosméticos (DANESI et al., 2004).

2.1.4 Produção e Aplicações

A primeira planta experimental para a produção de *A. platensis* foi desenvolvida na década dos anos 60 pelo Institut Française du Pétrole. Segundo

Ciferri e Tiboni (1985), o Japão e os Estados Unidos de América têm produção em escala industrial, além disso, mais de 40 tipos de produtos estão disponíveis no mercado. A indústria biotecnológica de microalgas tem se expandido significativamente no mundo (PULTZ; GROSS, 2004).

No Brasil, devido aos problemas de nutrição deficiente e pela existência de regiões com condições climáticas adequadas, a produção de *A. platensis* pode ser considerada como uma alternativa econômica e social (PELIZER et al., 2003).

No entanto, as utilizações de *Arthrospira* não são restritas à alimentação. Vários outros estudos foram realizados acerca das utilizações desta cianobactéria. Chronakis et al. (2000) destacaram que as proteínas de *A. platensis* podem ser usadas com estabilizantes de emulsões e espumas, como agentes emulsificantes e gelatinizantes, pois apresentam pequena tensão interfacial ar/água.

Mosulishvili et al. (2002) estabeleceram que selênio e iodo podem ser incorporados à biomassa desta cianobactéria sem alteração de suas propriedades naturais, e que o cultivo em condições controladas com a utilização de reagentes com alto grau de pureza, possibilita a utilização de *A. platensis* para a produção de produtos farmacêuticos.

Pultz e Gross (2004) estudaram os efeitos pré-bióticos de biomassa de *Arthrospira sp.* Os resultados demonstraram que componentes desconhecidos mantêm saudável a flora intestinal, assim, comprovou-se que a biomassa estimula o crescimento de *Lactobacillus acidophillus*.

Dentre as aplicações de *A. platensis*, encontram-se:

2.1.4.1 *Suplemento alimentar*

Em decorrência de sua composição química – presença de proteínas em grande quantidade, aminoácidos essenciais, ácidos graxos poliinsaturados e outros compostos fitoquímicos de ação antioxidante (HERRERO et al., 2005), as cianobactérias do gênero *Arthrospira* são atrativas para produção de alimentos ou suplementos alimentícios, seja para alimentação humana ou animal.

São inúmeros os estudos com *Arthrospira* focados na produção de biomassa com finalidade alimentícia. Morist et al. (2001), por exemplo, desenvolveram um processo de recuperação e uma série de tratamentos adicionais para utilização da biomassa, cultivada em FBR contínuo, na produção de alimento para sustento do

homem em missões espaciais. Concluíram que preparações baseadas nesta cianobactéria podem ser consideradas como uma fonte alimentar potencial com tal objetivo, pois a biomassa pode ser eficientemente obtida e tratada, e é estável quanto às suas características microbiológicas, químicas e nutricionais.

Existem estudos recentes que avaliam a possibilidade de incorporação de biomassa de *A. platensis* para enriquecimento nutricional de certos alimentos. Particularmente, Lemes et al. (2012) incorporaram *A. platensis* na farinha de trigo para preparar massas frescas de coloração verde e com enriquecimento nutricional. Além das propriedades funcionais, foram avaliadas as características sensoriais do produto final, bem como a atividade antioxidante nas formulações. Rabelo et al. (2013) estudaram a substituição da farinha de trigo pela mandioca, além da adição de biomassa de *A. platensis* e açúcar invertido, para desenvolver um 'sonho' com elevada taxa da Reação de Maillard para mascarar a coloração verde da biomassa da cianobactéria. Neste estudo, foi demonstrada a viabilidade da adição da biomassa para conferir enriquecimento nutricional sem afetar, de forma significativa, a aceitação sensorial e as características típicas do produto obtido.

2.1.4.2 *Alimentação animal*

Há diferentes estudos que descrevem a incorporação de biomassa de *A. platensis* em rações de peixes e outros animais marinhos e terrestres devido ao elevado valor nutritivo da mesma.

Takeuchi et al. (2002) reportaram que as tilapias da espécie *Oreochromis niloticus* apresentaram crescimento e composição corporal normal ainda quando alimentados simplesmente com *Spirulina*.

Tan et al. (2009) avaliaram os efeitos de biomassa de *Spirulina* no crescimento e composição química de pepino do mar *Apostichopus japonicus* e reportaram que a farinha de peixe na dieta pode ser substituída pela biomassa de *Spirulina* sem aparentes efeitos negativos.

Muitos estudos recentes explicam a aplicação de biomassa de *A. platensis* na alimentação de diversas espécies animais, como gado, frango, ovelhas e coelhos pela sua propriedade particular de ser uma fonte de elevado potencial nutritivo que favorece o crescimento, fertilidade e a qualidade final de produto alimentício (HOLMAN; MALAU-ADULI, 2012)

2.1.4.3 *Tratamento de efluentes*

Arthrospira tem sido utilizada como purificadora de efluentes pelo fato de remover os nitratos, fosfatos e outros elementos nele presentes. Em Israel, as águas são aproveitadas para produção de *Arthrospira spp*. e *Scenedesmus spp*., tentando implementar métodos menos custosos e eficientes no tratamento de água de efluentes industriais e domésticos. Em Londres, são usadas as águas do tratamento terciário de rejeitos para produzir biomassa e assim, as purificar (BECKER, 1981).

Recentemente, a biomassa de *A. platensis* tem sido testada para remoção de materiais indesejáveis como excesso de fertilizantes, metais pesados, corantes têxteis e pesticidas de diversos tipos de efluentes (CHOJNACKA; CHOJNACKA; GÓRECKA, 2005; LODI et al., 2008; PANE et al., 2008; RODRIGUES et al., 2012; SOLISIO et al., 2006).

Por fim, *A. platensis* tem sido testada na remoção de nitrogênio de diferentes efluentes. Particularmente, Markou, Vandamme e Muylaert (2014) testaram o uso de amônia proveniente de efluentes e demonstraram que o uso indireto de amônia através da sua adsorção em zeólitas e posterior liberação e transferência ao meio para o cultivo de *A. platensis* foi satisfatório. Apesar de terem sido perdidas elevadas quantidades de amônia no cultivo, a taxas da sua recuperação foram de aproximadamente 35 %, levando assim à produção de biomassa mesmo com a pouca quantidade de nitrogênio disponível.

2.2 *Processo de cultivo*

Para o cultivo temos dois tipos de sistema: FBR abertos como tanques abertos de moderada relação superfície/volume (3 – 10 m^{-1}) e FBR fechados com elevada relação superfície/volume (25 – 125 m^{-1}) (WEISSMAN; GOEBEL, 1987). Enquanto os sistemas de cultivo abertos são de baixo custo, os fechados fornecem outras vantagens (ROSELLO-SASTRE et al., 2007) como: maior relação superfície/volume, habilidade de prevenir contaminação, capacidade para obter alta densidade e alta produtividade de biomassa, e assim, alta taxa de fixação de CO_2.

O FBR tubular de configuração mais conhecida (TRAVIESO et al., 2001), tem uma sequência de tubos transparentes diretos para captar a luz solar. Um diâmetro

pequeno de tubo, geralmente 10 cm ou menos, é necessário para garantir elevada concentração celular máxima de biomassa.

No processo descontínuo, todo o substrato é adicionado no início do cultivo, mas o processo descontínuo alimentado é uma técnica onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e, os produtos aí permanecem até o final do processo. Nesta operação, a mudança de volume pode ou não ocorrer, dependendo da concentração de substrato no meio de alimentação e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO; SATO, 2001). Este processo é utilizado para minimizar a formação de produtos tóxicos de metabolismo, adequação do processo fermentativo a condições operacionais e estudo de cinética de processos fermentativos.

O processo descontínuo alimentado é uma técnica muito útil quando se trata de evitar fenômenos de inibição por substrato e de adequar condições operacionais em processos fermentativos. Encontra aplicação em produção de levedura (LEE; KIM, 2001), antibióticos (CRUZ et al., 1999), aminoácidos (SASSI et al., 1998), etanol (CARVALHO et al., 2004), enzimas (ECHEGARAY et al., 2000), e até mesmo em cultivo de células animais (XIE; WANG, 1994).

A utilização do processo descontínuo alimentado para o cultivo de *Spirulina platensis* permitiu a obtenção de resultados bastante satisfatórios com o uso de ureia (DANESI et al., 2002; MATSUDO et al., 2009). Resultados igualmente promissores com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio foram encontrados (SOLETTO et al., 2005).

2.3 *Reaproveitamento de meio*

O mercado de biomassa de microalgas é da ordem de 5000 t/ano de material seco e gera aproximadamente US$ $1{,}25\times10^{9}$ ano^{-1} (PULTZ; GROSS, 2004). É importante mencionar que há carência de informação na literatura sobre reuso dos nutrientes presentes no efluente obtido ao final dos cultivos.

Assim, considerando que a produção em sistemas abertos ou fechados e o mercado de *A. platensis* tem crescido consideravelmente nos últimos anos, é importante propor uma metodologia para reaproveitamento do meio obtido no final dos cultivos.

Jourdan (2006) descreve um procedimento para renovar o meio de cultivo considerando que deve se realizar uma limpeza tirando 1 % do meio em cada dia de cultivo. Sugere o controle dos oligoelementos presentes no meio para evitar uma carência dos mesmos porque influenciaria na qualidade da biomassa final. Também sugere um procedimento para realizar uma depuração realizando combinação de processos de filtração, decantação e tratamento biológico natural, utilizando luz em tanques abertos com tempo de residência de 2 a 4 semanas para posteriormente ser descartado.

Jourdan (2006) afirma que a decantação permite a sedimentação de exapolisacarídeos (EPS) e que a passagem do meio por filtro de areia seguida por uma oxidação biológica com borbulhamento de ar com aproveitamento da flora bacteriana do ambiente, sem precisar de inoculação de outros micro-organismos, permite a diminuição nos valores de demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO) e coloração do meio.

Por se tratar de uma etapa da produção de *A. platensis* quase inexplorada atualmente. O presente trabalho pretende desenvolver técnicas para reaproveitar o meio de cultivo, tendo em vista resultados promissores de cultivos em meios reaproveitados provenientes de tratamentos físico-químicos (USP, BR n. PI 018100034532). Dessa forma, foram avaliadas as remoções de matéria orgânica, incluindo pigmentos, e o crescimento de *A. platensis* no meio tratado, levando a resultados inéditos na literatura.

Para tanto, a seguir, encontram-se os fundamentos da escolha dos diferentes processos físico-químicos utilizados neste trabalho.

2.3.1 Floculação com agentes químicos

Para a eliminação de matéria orgânica (MO) no meio de cultivo é necessário que se promova a coagulação química e a floculação das partículas dispersas no meio a ser tratado para posterior reuso.

Segundo Odegaard (1979), o processo de formação e separação dos flocos pode ser dividido em três etapas: coagulação/precipitação, floculação e separação (sedimentação, flotação ou filtração). Há formação de flocos em todas as etapas, mas na primeira etapa ocorre a formação inicial de coágulos. Após a coagulação, as partículas possuem tamanhos na faixa entre 0,5 µm e 5 µm e são denominadas

partículas primárias. Na floculação, as partículas primárias agregam-se em consequência das colisões promovidas, ocorrendo a formação de flocos, na faixa entre 100 µm e 5000 µm. Na coagulação, o processo é consumado em questão de segundos, enquanto a floculação e a separação dos flocos são etapas que demandam tempo superior a alguns minutos. Dessa forma, neste trabalho, para simplificação de termos, o processo total foi denominado floculação.

Os coagulantes (floculantes) mais comuns são sais de ferro ou de alumínio, cal e polímeros orgânicos sintéticos. Quando sais de ferro, sais de alumínio ou cal são adicionados às águas residuárias, ocorrem pelo menos dois processos diferentes e de interesse: coagulação (ou desestabilização) das partículas (colóides) e precipitação de fosfato solúvel. O processo de coagulação é responsável pela separação das impurezas associadas às partículas, causando remoção de DBO entre 70 % e 75 % no esgoto bruto e remoção de sólidos suspensos entre 95 % e 98 % (ODEGAARD, 1979). Ainda segundo o referido autor, a maioria dos contaminantes presentes nas águas residuárias é constituída por partículas sólidas ou estão associadas a elas. A dupla camada elétrica existente em sua superfície impede a ligação entre as partículas coloidais. A desestabilização química é conseguida através da adição de produtos químicos desestabilizantes (coagulantes), que aumentam a tendência de agregação ou fixação dos colóides.

2.3.2 Adsorção por carvão ativado

O uso do carvão ativado se conhece desde a antiguidade, pela sua propriedade adsortiva. No século XX (décadas de 20 e 30), em algumas das unidades de tratamento de água de cidades alemães, o carvão ativado foi usado para remover o sabor da água bruta e na remoção de subprodutos de cloro na água tratada. Com esse mesmo objetivo, em 1928 nos Estados Unidos, o carvão ativado foi utilizado no tratamento de água em Chicago.

A fabricação do carvão ativado inclui: carbonização da matéria prima (madeira, casca de coco, sementes, etc.) ou tratamento térmico do material em atmosfera inerte a elevada temperatura e a ativação do produto em atmosfera redutora. No final é produzida uma estrutura altamente porosa e de grande área superficial, na qual os contaminantes podem se aderir.

O carvão ativado esta disponível em duas formas: pó (*CAP*) e granular (*CAG*). O tamanho das partículas tem seu efeito na capacidade de adsorção do carvão, partículas menores de *CAG* demonstraram ser mais eficientes (JAGUARIBE et al., 2005).

2.3.2.1 *Adsorção em carvão ativado granulado (CAG)*

O *CAG* é geralmente usado sob a forma de meios filtrantes em tanques ou filtros através dos quais passa a água. Quando o *CAG* é utilizado no tratamento, a superfície dentro dos poros vai gradualmente sendo coberta com moléculas químicas, até que o carvão não seja capaz de adsorver novas moléculas, então o carvão deve ser retirado, reativado ou substituído por um novo, virgem ou fresco (BRADY, 1997).

Existem três opções de localização do *CAG* no tratamento convencional de água: o pré-tratamento, onde o *CAG* é colocado antes da filtração do tratamento convencional; a pós-filtração, em que o *CAG* é implantado depois da filtração convencional; e a filtração/adsorção, que é um processo combinado de filtração convencional com *CAG* (Figura 02).

A opção mais usual é a pós-filtração, em que a água tratada passa pelo *CAG* apenas para remover os compostos orgânicos dissolvidos.

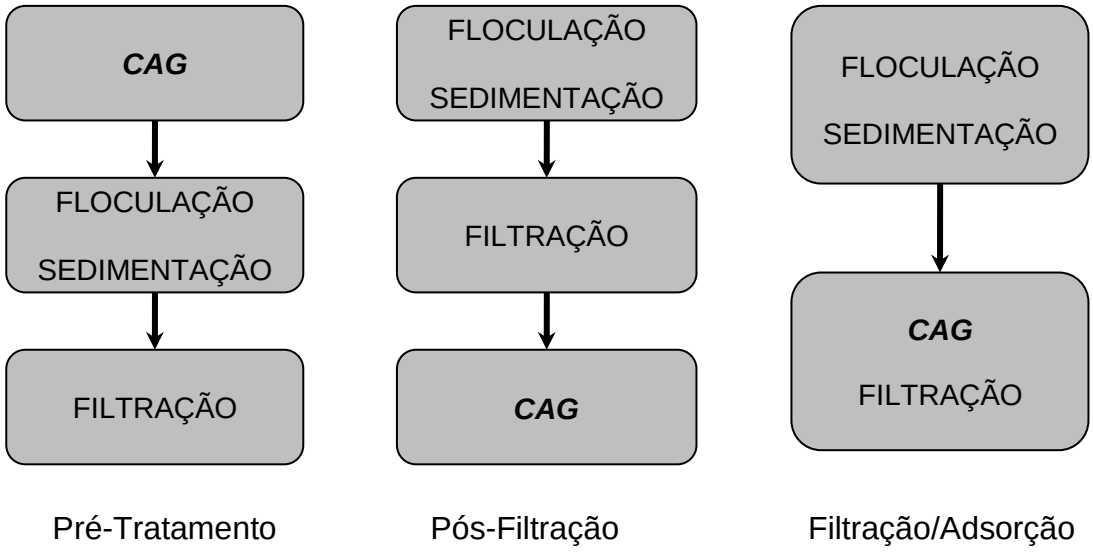

Figura 02 – Opções de locação do *CAG* no tratamento de água (BRADY, 1997).

Outras características adicionais a serem consideradas são: densidade e umidade do carvão; distribuição, tamanho e forma das partículas; resistência à abrasão; parâmetros de projeto tais como expansão de meio filtrante e perda de carga; cinética de adsorção; e possibilidade de regeneração.

O tamanho efetivo das partículas do carvão é um fator importante para determinação da duração das carreiras de filtração. A escolha do tamanho efetivo das partículas do carvão baseia-se na qualidade da água a ser tratada.

A regeneração do *CAG* envolve dois processos consecutivos: a desorção da matéria aderida no carvão e a reativação, restaurando ao máximo possível, a superfície interna e a estrutura dos poros do carvão. A regeneração do carvão pode ser biológica, química ou térmica.

Moore et al. (2001), verificaram que o *CAG* reativado alcançou percentuais de remoção de carbono orgânico total (COT) mais elevados do que o *CAG* virgem, e foi reutilizado por seis ciclos sem comprometer a sua eficiência.

2.3.2.2 *Adsorção em carvão ativado em pó (CAP)*

A principal diferença entre o *CAP* e o *CAG* é o tamanho das partículas do material. Assim, o *CAP* possui partículas com no máximo 100 μm de tamanho. As principais vantagens do uso de *CAP* em relação ao *CAG* são o investimento inicial baixo e a flexibilidade na alteração da dosagem aplicada de acordo com as variações na qualidade de água. Porém, a impossibilidade de regeneração, a dificuldade de disposição do lodo e a própria remoção de partículas são as desvantagens quando o *CAP* é utilizado. O *CAP* é adicionado à água, misturado por um período de tempo e depois removido.

A adsorção de moléculas ocorre enquanto está em contato com a água. O *CAP* pode ser adicionado em diferentes pontos de aplicação, como na tomada de água, em tanques de contato na chegada de água bruta na estação, na unidade de mistura rápida ou na entrada dos filtros (Figura 03).

Todos os pontos de aplicação oferecem vantagens e desvantagens, sendo necessária uma avaliação com base nos critérios seguintes para sua escolha: mistura eficiente, tempo de contato suficiente para garantir a adsorção dos contaminantes, interferência mínima com os demais produtos químicos utilizados no tratamento e nenhuma alteração na qualidade final da água (SNOEYINK, 1990).

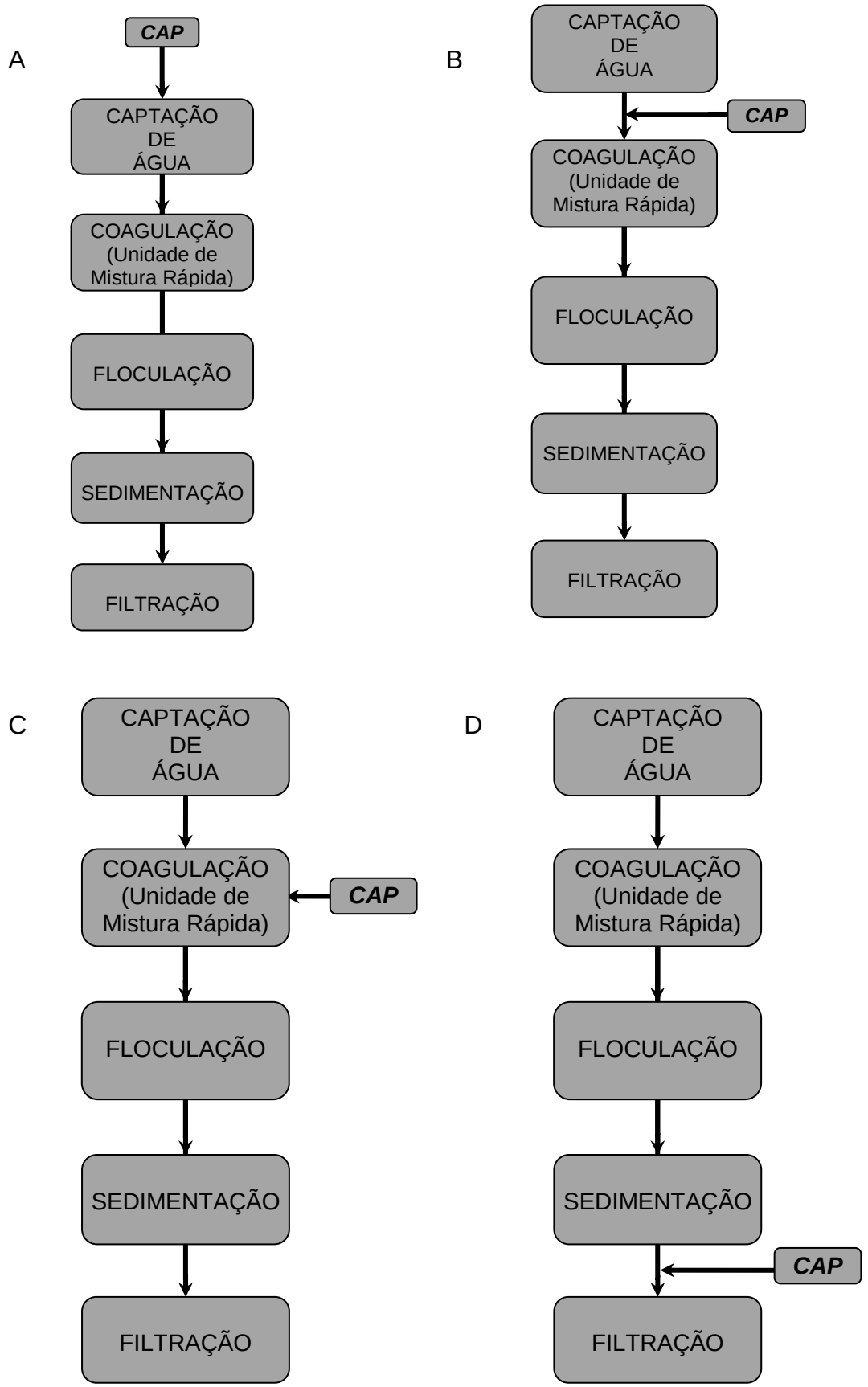

Figura 03 – Pontos de aplicação do *CAP* no tratamento: A. na tomada de água, no inicio da adutora de água bruta, B. na chegada de água bruta da estação, C. na unidade de mistura rápida e D. na entrada dos filtros (SNOEYINK, 1990).

A adição do *CAP* na tomada de água tem a vantagem de favorecer um longo tempo de contato. Em geral, todos os pontos de aplicação antes da unidade de mistura rápida levam a um consumo maior de carvão, pois algumas impurezas que poderiam ser removidas pela coagulação, floculação e sedimentação, poderão ser adsorvidas no carvão.

A aplicação do *CAP* na mistura rápida favorece uma excelente mistura e um tempo de contato razoável com a água a ser tratada, contudo há possibilidade de interferência do coagulante no processo de adsorção. Quando o *CAP* é adicionado antes dos filtros pode haver passagem do carvão através do meio filtrante.

Os equipamentos de testes de jarros são frequentemente utilizados para determinar a dosagem de *CAP* necessária para alcançar a remoção desejada de um dado composto no tratamento de água (SNOEYINK, 1990).

Alguns dos parâmetros estabelecidos pelas Normas Brasileiras estão apresentados no Quadro 01.

Quadro 01 – Parâmetros estabelecidos pela norma EB-2133 para o fornecimento de carvão ativado em pó, utilizado na adsorção de impurezas no tratamento de água para abastecimento público.

Características *CAP*	**Limites**
Numero de iodo (mg I_2 g^{-1})	600 mín.
Índice de fenol (g L^{-1})	2,5 máx.
Umidade (% em massa)	8,0 máx.
Massa especifica aparente (g cm^{-2})	0,20 a 0,75
Granulometria (% em passa passante)	
Peneira ABNT n. 100	99,0 mín.
Peneira ABNT n. 200	95,0 mín.
Peneira ABNT n. 325	90,0 mín.

CAP e *CAG* tem sido utilizados amplamente na remoção de diversos compostos tóxicos de água e efluentes industriais. Hanigan et al. (2012) avaliaram o uso de *CAP* e *CAG* na remoção de precursores de N-nitrosodimetilamina, composto potencialmente carcinogênico e genotóxico, de misturas de água de rio e de efluentes de uma estação de tratamento de águas residuárias. Os valores de

remoção de carbono orgânico total (COT) e RA_{254} atingidos neste trabalho quando usado *CAG* foram de aproximadamente 40 e 60 %, respectivamente.

2.3.3 Remoção de matéria orgânica e pigmentos

2.3.3.1 *Remoção de matéria orgânica*

O meio de cultivo a ser reaproveitado, tem elevada turbidez devido à MO presente em suspensão. É bem conhecido que nas estações de tratamento de água, a remoção da MO natural dissolvida tem sido encarada como a melhor estratégia para minimizar a formação de sub-produtos da cloração, tais como trialometanos, ácidos haloacéticos, halopicrina, haloacetonitrilas, halocetonas e cloro hidrato. Em anos recentes, muitos esforços têm sido desenvolvidos nas tecnologias de tratamento de água e efluentes de diversas origens para permitir desenvolver métodos encarregados da eliminação de MO em quantidade elevada.

Processos convencionais no tratamento de água como coagulação, floculação, sedimentação e filtração são considerados os métodos mais comumente empregados na remoção de MO de águas naturais. A efetividade na remoção de MO utilizando o processo de coagulação está influenciada por vários fatores como: natureza e propriedades das partículas de MO, tipo e dose de coagulante, pH, força iônica e temperatura (KABSCH-KORBUTOWICZ, 2005).

Velten et al. (2011) caracterizaram a adsorção de MO natural em *CAG*. Foi reportado que a adsorção com *CAG* é mais efetiva no controle de material precursor para subprodutos de desinfeção em águas que contenham grande quantidade de MO natural de baixa massa molar.

Porém, na literatura apresentam-se diversas estratégias de remoção de MO utilizando combinações de diferentes processos físico-químicos. Por exemplo, em estudo recente, Johir et al. (2013) testaram a aplicação de membranas de filtração de aço e métodos de pré-tratamento como floculação com cloreto férrico (*F*), adsorção com *CAP*, troca iônica em coluna de *purolite* e troca iônica em coluna de *purolite* seguida de floculação com *F.* Foi demonstrado que o pré-tratamento incrementou o desempenho da membrana de filtração, como resultado obtendo-se uma boa eficiência (68 – 91 %) de remoção de carbono orgânico dissolvido (COD).

Particularmente, Shon et al. (2012) mostraram que a ultrafiltração remove apenas uma parte da MO do efluente de esgoto biologicamente tratado. A maior remoção de MO foi observada quando aplicada a floculação com *F* seguida de adsorção com *CAP*, removendo MO tanto de pequeno quanto de grande tamanho. Desta forma, a associação de processos de floculação e adsorção está justificada neste trabalho e foram avaliadas algumas técnicas de tratamento que associam processos de floculação com sais férricos e processos de adsorção com *CAP.*

Não há estudos de aplicação de processos físico-químicos na remoção de MO de meio de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes. Assim, este trabalho propõe a medição da absorbância em luz ultra-violeta no comprimento de onda de 254 nm (A_{254}) como uma alternativa de leitura e avaliação rápida da remoção de MO do meio após cada tratamento devido a que foi demonstrado que A_{254} está diretamente relacionada com a concentração de MO em água, especialmente com o conteúdo de carbono aromático (EDZWALD; BEKER; WATTIER, 1985; CROUE et al., 1999).

Edzwald, Beker e Wattier (1985) e Weishaar et al. (2003) explicaram que a leitura de A_{254} é um bom parâmetro substituto para monitorar MO e material precursor para subprodutos de desinfeção por ser de fácil e rápida leitura nos processos de monitoramento nas plantas de tratamento de efluentes industriais.

Sabe-se que há três estratégias para alcançar remoção de MO natural para águas de elevada alcalinidade, a seguir:

2.3.3.1.1 Controle de pH

Yan et al. (2009) demonstraram que o ajuste de pH antes da coagulação com $FeCl_3$ e $AlCl_3$ é recomendável para remover MO, especialmente quando usado cloreto férrico, sendo os valores de pH ótimos iguais a 5,0 e 6,3 para $FeCl_3$ e $AlCl_3$, respectivamente. Porém, o controle de pH tem desvantagens (CARLSON et al., 2000) como o aumento da tendência corrosiva da água tratada. Além disso, a adição de ácido ou base para controle de pH aumenta o custo de processo e aumenta a complexidade do tratamento de água. Nesse sentido, os meios utilizados neste trabalho apresentam valores de pH (9,2 – 10,0) acima dos valores ótimos já mencionados para os agentes floculantes acima citados, mas a diminuição de pH não seria vantajosa com vistas ao reuso desses meios após seu tratamento, pois

seu restabelecimento ao valor inicial estaria associado a uma salinização do mesmo, o que a longo prazo inviabilizaria o processo de reuso.

2.3.3.1.2 Otimização da quantidade de coagulante

A remoção de turbidez e COD correlaciona a dissociação dos coagulantes com a solubilidade mínima de $FeCl_3$ e $AlCl_3$ a pH 5,8 e pH 6,3 respectivamente. A remoção de COD é mais eficiente com valor de pH menor do que a sua solubilidade mínima porque neste pH os produtos da hidrólise de $FeCl_3$ e $AlCl_3$ são polímeros médios ou monômeros, que têm elevada habilidade de remover COD por complexação e neutralização de cargas (YAN et al., 2009). Para diminuir as desvantagens dos coagulantes tradicionais, têm sido desenvolvidos novos coagulantes sintéticos como o denominado composto de alta eficiência de policloreto de alumínio (HPAC), que inclui uma modificação do coagulante polimérico inorgânico policloreto de alumínio (PACl) combinado com silicatos (Yan, 2006). Além disso, a remoção de partículas de MO de águas com elevada alcalinidade e com micro-poluentes, foi potencializada com o uso, em escala piloto, de coagulação por HPAC seguido de pré-ozonização, flotação e filtração (YAN et al., 2006; YAN et al., 2007; YAN et al., 2008a); ou seja, utilizando uma combinação de processos de tratamento.

2.3.3.1.3 Abrandamento com coagulante

Sabe-se que o abrandamento é empregado no tratamento de água para remover íons metálicos polivalentes, Ca^{2+} e Mg^{2+}.

Yan et al. (2008b) reportaram que elevada remoção de MO natural (remoção de A_{254} de aproximadamente 50 %) foi atingida com adição de PACl quando comparada com coagulação convencional a pH sem alteração. PACl pode incrementar remoção de MO mais eficientemente que $FeCl_3$ e $AlCl_3$ utilizando valores baixos de pH (pH < 10). Mesmo assim, foi demonstrado que o conteúdo de Mg^{2+} na água afeta o desempenho do abrandamento (YAN et al., 2008b).

2.3.3.2 *Remoção de pigmentos*

Finalmente, o meio de cultivo utilizado, além de apresentar MO, possui leve coloração, provavelmente devido à presença de clorofila. Portanto, a falta de informação na remoção de pigmentos em meio após cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, levou a definir como parâmetro a medição da absorbância em luz visível no comprimento de onda de 440 nm (A_{440}), por se tratar do comprimento de onda em que a clorofila-a apresenta seu pico de maior absorbância (FERRARI; TASSAN, 1999)

2.3.4 Métodos de separação em cultivos de cianobactérias

Os métodos comuns na separação de suspensões sólido-líquido, ou seja, os mais usados na colheita de cianobactérias são: sedimentação, centrifugação, filtração, ultrafiltração, às vezes com uma etapa adicional de floculação ou uma combinação de floculação/flotação (GRIMA et al., 2003).

A aplicação de diversas metodologias na separação de cianobactérias depende da espécie a ser avaliada e principalmente da utilidade dos processos a serem aplicados. A seguir explicam-se essas metodologias e justifica-se o uso da filtração na técnica que foi desenvolvida.

2.3.4.1 *Processos Químicos*

Devido ao pequeno tamanho de cianobactérias e microalgas, a floculação química é utilizada como pré-tratamento para aumentar o tamanho da partícula antes da utilização de outros métodos de flotação para separação do micro-organismo.

2.3.4.1.1 Floculação

Procedimento onde o material protéico suspenso no meio líquido forma agregados estáveis para facilitar sua separação mediante sedimentação, centrifugação e/ou filtração. O processo é facilitado pela adição de compostos

químicos (agentes floculantes) e pela adição de outras substâncias coadjuvantes ao processo.

Os agentes floculantes mais comumente utilizados são: cloreto férrico e sulfato de alumínio em concentrações que variam dependendo da característica do efluente a ser utilizado, 10 – 150 mg L^{-1} e 10 – 160 mg L^{-1}, respectivamente. O hidróxido de cálcio não foi utilizado porque provocaria precipitação dos componentes do meio.

As substâncias coadjuvantes ou auxiliares na coagulação mais comumente utilizadas são os polímeros naturais como amido e uma variedade de polímeros sintéticos. A quitosana é outra substancia que também poderia ser utilizada, bem como outros eletrólitos e polímeros sintéticos que coagulam (neutralizam as cargas) e permite a floculação das células. (BERNHARDT; CLASEN, 1991). Há poucos estudos da aplicação desses polímeros naturais.

2.3.4.2 *Processos Mecânicos*

2.3.4.2.1 Centrifugação

Processo de separação de misturas utilizado para acelerar a decantação ou sedimentação, onde o corpo mais denso da mistura sólido-líquido deposita-se no fundo do recipiente devido à ação da gravidade. Este processo é rápido e pode se aplicar a maior parte de micro-organismos fotossintetizantes, porém necessita de investimento de operação elevado. (SHELEF; SUKENIK; GREEN, 1984)

2.3.4.2.2 Filtração

Processo no qual uma mistura de líquido e partículas contidos em uma suspensão, são separados pela passagem desta através de um meio filtrante contendo material poroso, sob o efeito de um diferencial de pressão. A separação ocorre por retenção das partículas sólidas neste leito. O diferencial de pressão aumenta no decorrer da filtração que transcorre até o limite dimensional do equipamento ou sistema.

Geralmente é utilizado para micro-organismos filamentosos. Devido à morfologia espiralada de *A. platensis*, este processo é o mais apropriado na separação da mesma do meio a ser reaproveitado.

A filtração de fluxo tangencial pode ser aplicada no final da filtração, desde que sejam considerados o “fouling” e troca desse tipo de filtros (UDUMAN et al., 2010).

Adicionalmente, os filtros-prensa operados usando pressão ou vácuo podem ser usados para coletar grandes quantidades de biomassa, mas em algumas aplicações, a filtração não é muito eficiente; assim, pode-se utilizar em grande escala para recuperar biomassa de *Coelastrum proboscedeum* e *A. platensis*, mas não é eficiente com micro-organismos de menor tamanho como *Scenedesmus, Dunaliella* ou *Chlorella*. (GRIMA et al., 2003).

2.3.4.2.3 Sedimentação

Processo de separação sólido–líquido que tem como força propulsora a ação da gravidade. É um processo de baixo custo e geralmente oferece concentrações de 1,5 % de sólidos (UDUMAN et al., 2010), mas devido à flutuação na densidade de células, a sua confiabilidade é pequena (SHEN et al., 2009).

2.3.4.2.4 Flotação por ar dissolvido (FAD)

As bolhas de ar têm carga eletrostática, e desse modo, os materiais orgânicos suspensos no meio líquido são atraídos pelas bolhas carregadas com carga oposta. Então, as bolhas sobem até a superfície do líquido levando consigo o material orgânico, formando camadas de espuma que serão retiradas posteriormente.

A flotação com ar dissolvido utiliza um particular modo de introduzir as bolhas de ar no tanque de flotação. O aparelho dissolve ar na água a ser tratada, passando-a por uma bomba de pressão, introduzindo ar, e retendo a mistura ar-água com pressão alta e suficiente para saturar a água com ar a alta pressão (pressões típicas de 20 – 75 psi). Após a saturação, a água passa por uma zona de diminuição de pressão, onde o ar ascende como bolhas diminutas. Esse processo de criação de bolhas de ar tem duas vantagens em comparação com outros métodos: produzem-se bolhas na faixa de 40 – 70 μm (bolha de 500 μm é considerada pequena), que

apresentam maior área superficial do que as bolhas maiores. O volume de ar corresponde a uma área superficial 10 vezes maior do que a correspondente às bolhas de 500 μm (CHEREMISINOFF, 2001). A maior vantagem da FAD é que pode ser aplicada em grande escala.

O Quadro 02 compara os métodos mecânicos de separação de microalgas (CHRISTENSON; SIMS, 2011).

Quadro 02 – Métodos mecânicos de separação de microalgas.

Método	Concentração de sólidos (%)	Recuperação (%)	Escala	Vantagens	Limitações
Centrifugação	12 – 22	> 90	Laboratório	Confiável, elevada concentração de sólidos	Elevada energia, elevado custo
Filtração tangencial	5 – 27	70 – 90	Laboratório	Confiável, elevada concentração de sólidos	Troca membrana, elevado custo
Sedimentação	0,5 – 3	10 – 90	Piloto	Baixo custo	Lento, não confiável
Flotação por ar dissolvido	3 – 6	50 – 90	Piloto	Provado em grande escala	Requer floculantes

(Fonte: CHRISTENSON; SIMS, 2011)

2.3.4.3 *Processos Elétricos*

Os processos baseados na eletroforese das células de algas são utilizados devido à carga negativa das suas células que podem ser concentradas através de um campo elétrico. A vantagem seria a não utilização de compostos químicos, porém precisa da aplicação de energia e eletrodos que elevam seu custo em escala industrial (UDUMAN et al., 2010).

2.3.4.4 *Processos Biológicos*

A auto-floculação acontece no meio com pH elevado pelo consumo de CO_2 dissolvido. A bio-floculação ocorre pela excreção de biopolímeros; e condições como luz e temperatura podem influenciar no processo (UDUMAN et al., 2010).

2.3.4.5 *Outras alternativas*

Weissman e Goebel (1987) estudaram os seguintes métodos de colheita de biomassa para sua utilização como biocombustíveis: micropressão, cinturão filtrante, flotação com coleta flotante e sedimentação. Os aparelhos usados na micropressão são de muita utilidade pela simplicidade mecânica e disponibilidade em tamanhos de escala industrial. Mesmo assim, outros estudos concluem com a necessidade na utilização de floculantes antes do processo.

Por outro lado, Richmond (2004) sugere um critério para escolher o processo de colheita da biomassa em função da qualidade desejada do produto. Para produtos de custo baixo, pode-se usar sedimentação ajudada por floculação. Para produtos de alto custo, no caso de biomassa para aplicações como alimento ou aquicultura, é recomendável utilizar centrífugas de operação contínua para processar grandes quantidades de biomassa. Além disso, esses aparelhos concentram muito rapidamente qualquer tipo de micro-organismos e podem ser facilmente limpos e esterilizados para evitar contaminação bacteriana e cumprir as exigências para este tipo de produtos.

Finalmente, considerando todos esses fundamentos teóricos, neste trabalho foram desenvolvidas e avaliadas algumas associações de processos de tratamento para cultivos de *A. platensis* em batelada ou batelada alimentada: floculação com sais férricos e adsorção com *CAP* em processo simultâneo e floculação com cloreto férrico seguida de adsorção em coluna de *CAG*; ambas as associações seguidas por filtração do material remanescente. Inclusive foi avaliado o acoplamento de tratamento de CAG em coluna ao processo contínuo de cultivo de *A. platensis*.

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como principal objetivo verificar o reaproveitamento do meio proveniente de cultivo de *Arthrospira platensis* em fotobiorreator tubular, com uso de ureia como fonte de nitrogênio, aplicando técnicas físico-químicas para remoção de matéria orgânica do meio utilizado.

Como objetivos específicos podem ser listados:

- Desenvolvimento e aplicação de metodologias de reaproveitamento de meio de cultivo utilizando processos físico-químicos de floculação e adsorção.

- Avaliação da influência das concentrações de carvão ativado em pó (*CAP*), de agente coagulante (cloreto férrico ou sulfato férrico) e do tempo de contato na remoção de material orgânico de meio exaurido de *A. platensis*, bem como otimização de ditas condições de tratamento para o reuso do meio tratado em novos cultivos celulares.

- Avaliação da influência da quantidade de carvão ativado granular (*CAG*), de cloreto férrico como agente coagulante e dos tempos de residência na remoção de material orgânico de meio exaurido de *A. platensis*, bem como otimização de ditas condições de tratamento para o reuso do meio tratado em novos cultivos celulares.

- Avaliação do crescimento de *A. platensis* nas condições otimizadas de remoção de material orgânico correspondente a cada planejamento experimental, utilizando como variáveis dependentes a concentração celular máxima, a produtividade em células, bem como a composição da biomassa, em cultivos em frascos Erlenmeyer e FBR tubulares.

- Avaliação do cultivo contínuo de *A. platensis* em fotobiorreator tubular com uso de meio exaurido tratado simultaneamente em coluna com carvão ativado granulado (*CAG*).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 *Micro-organismo*

O micro-organismo utilizado para a realização dos cultivos foi *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* UTEX 1926, proveniente da UTEX (*The Culture Collection of Algae of the University of Texas at Austin* – US).

Esta cianobactéria foi mantida em meio de cultivo líquido padrão (SCHLÖSSER, 1982), em temperatura ambiente (30 ± 1 °C) e sem agitação, sob intensidade luminosa continua de 7,0 ± 0,3 µmol fótons m^{-2} s^{-1}.

4.2 *Meios de cultivo*

Foram utilizados dois tipos de meio de cultivo: um **meio padrão** (Quadro 03), contendo nitrato de sódio como fonte de nitrogênio (SCHLÖSSER, 1982) com salinidade total de 20,57 g L^{-1}, e este mesmo meio, porém preparado com 3,1 mmol L^{-1} ureia em substituição ao nitrato de sódio, denominado **meio modificado**.

O meio de cultivo padrão foi utilizado para a manutenção do micro-organismo e preparo do inóculo, enquanto que o meio de cultivo modificado foi utilizado para a realização de todos os cultivos com vista à obtenção de meio a ser tratado. A fonte de nitrogênio foi adicionada posteriormente conforme o plano de alimentação. O valor de pH inicial de ambos os meios de cultura foi 9,5 ± 0,2.

Nos cultivos em batelada, o meio obtido após os diferentes tratamentos descritos a seguir, denominou-se **meio tratado**.

Nos cultivos contínuos, o meio de cultivo modificado, porém, constituído de diferentes proporções de bicarbonato e carbonato de sódio, de modo a se atingir valores de pH de 9,0 ± 0,1, sempre mantendo a quantidade total de carbono do meio padrão, foi denominado como **meio fresco**. O **meio tratado** foi o meio exaurido da coluna de *CAG* após tratamento contínuo. Por fim, denominou-se **meio misto**, à mistura de diferentes proporções de meio fresco e meio tratado, com valores de pH de 9,0 ± 0,1 corrigidos com CO_2 proveniente de cilindro.

Quadro 03 – Composição do meio de cultivo de Schlösser (SCHLÖSSER, 1982).

Reagente químico	Concentração do sal (g L^{-1})
$NaHCO_3$	13,61 g L^{-1}
Na_2CO_3	4,03 g L^{-1}
K_2HPO_4	0,50 g L^{-1}
$NaNO_3$	2,50 g L^{-1}
K_2SO_4	1,00 g L^{-1}
NaCl	1,00 g L^{-1}
$MgSO_4.7H_2O$	0,20 g L^{-1}
$CaCl_2.2H_2O$	0,04 g L^{-1}
Vitamina B_{12}	1 mL L^{-1}
Solução PIV–metal *	6 mL L^{-1}
Solução CHU **	1 mL L^{-1}

*Solução de metais-PIV (mg L^{-1}): Na_2EDTA, 750; $FeCl_3.6H_2O$, 97; $MnCl_2.4H_2O$, 41; $ZnCl_2$, 5; $CoCl_2.6H_2O$, 2; $Na_2MoO_4.2H_2O$, 4. **Solução de micronutrientes-CHU (mg L^{-1}): Na_2EDTA, 50; H_3BO_3, 618; $CuSO_4.5H_2O$, 19,6; $ZnSO_4.7H_2O$, 44; $CoCl_2.6H_2O$, 20; $MnCl_2.4H_2O$, 12,6; $Na_2MoO_4.2H_2O$, 12,6.

4.3 *Inóculo*

Uma parte da cultura de *A. platensis* mantida no laboratório foi transferida, sob condições assépticas, para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio de cultivo líquido padrão (SCHLÖSSER, 1982). Após quinze dias, a suspensão celular (fração celular e meio de cultivo) foi transferida para frascos *Erlenmeyer* de 500 mL, contendo 200 mL do mesmo meio de cultivo previamente citado. Estes frascos foram mantidos em agitador rotativo com frequência de agitação de 100 rpm, temperatura de 30 ± 1 °C (VONSHAK, 1997) e intensidade luminosa de 6 klux (72 µmol fótons m^{-2} s^{-1}) (CARVALHO et al., 2004) por cerca de seis a oito dias, de modo a se obter células em crescimento exponencial (PELIZER et al., 2003).

A suspensão celular de *A. platensis* foi filtrada, lavada com solução fisiológica para retirada do nitrato de sódio, e ressuspensa em meio de cultivo padrão sem fonte de nitrogênio. Esta suspensão serviu de inóculo para todos os cultivos deste

trabalho. A concentração celular inicial de cada cultivo em FBR tubular foi de 400 mg L^{-1} (SOLETTO et al., 2008) e em frascos Erlenmeyer foi de 50 mg L^{-1} (PELIZER et al., 2003).

4.4 *Experimentos realizados*

4.4.1 Obtenção de meio de cultivo

4.4.1.1 *Meio obtido a partir do processo em batelada alimentada*

Foi obtido o meio de cultivo segundo as condições indicadas por Morocho-Jácome et al. (2012), em que se utiliza ureia como fonte de nitrogênio (1,16 mmol L^{-1} d^{-1}) no cultivo de batelada alimentada em FBR tubular. Os FBR tubulares utilizados foram do tipo *air-lift*, desenvolvidos no Laboratório de Tecnologia de Fermentações do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Cada FBR é constituído de tubos transparentes de diâmetro interno de 1,0 cm. O volume total do sistema foi de 3,5 L e o volume iluminado correspondeu a 2,0 L, com fluxo da cultura de 40 ± 1 L h^{-1}. A intensidade luminosa foi fixada em 120 µmol fótons m^{-2} s^{-1} usando lâmpadas fluorescentes super luz do dia, com intensidade medida usando medidor de intensidade luminosa LICOR LI-250A (Lincoln, NE). A temperatura foi mantida em 32 ± 1 °C (MOROCHO-JÁCOME et al., 2012).

4.4.1.2 *Meio obtido a partir do processo contínuo*

O meio de cultivo fresco (Item 4.2), com uso de ureia como fonte de nitrogênio, foi utilizado para avaliar os efeitos de diferentes proporções de meio tratado no cultivo contínuo de *A. platensis*.

O cultivo contínuo em FBR tubular foi precedido por um processo em batelada alimentada durante 7 dias, com adição intermitente de 1,16 mmol L^{-1} d^{-1} ureia (MOROCHO-JÁCOME et al., 2012). No quinto dia, os experimentos foram conduzidos com processo contínuo, adicionando meio fresco, isento de $NaNO_3$, com 3,1 mmol L^{-1} ureia, com vazão específica de alimentação (D) de 0,6 d^{-1} para maximizar a produtividade celular, P_X (MATSUDO et al., 2011). A intensidade

luminosa foi fixada em 120 µmol fótons m^{-2} s^{-1} usando lâmpadas fluorescentes super luz do dia medida com medidor de intensidade luminosa LICOR LI-250A (Lincoln, NE). A temperatura do meio de cultivo foi mantida em 29 ± 1 °C mantendo a temperatura da sala em 26 ± 1 °C (MATSUDO et al., 2011).

Durante o processo contínuo, uma bomba peristáltica foi usada na alimentação de meio modificado com 3,1 mmol L^{-1} ureia ou meio misto, com ou sem adição de ureia. Outro canal da mesma bomba peristáltica foi usado na remoção simultânea da suspensão celular de *A. platensis* para ser filtrada concomitantemente. O volume de meio foi mantido constante ao longo dos experimentos.

4.4.2 Tratamentos de meio

As frações líquidas dos meios de cultivo provenientes de cultivos prévios por processo de batelada alimentada e com ureia como fonte de nitrogênio (item 4.4.1.1), separadas das frações celulares por filtração, foram denominadas **meios exauridos** e foram tratadas de acordo com o estabelecido nos itens 4.4.2.1.1 a 4.4.2.1.3. Após sofrer esses tratamentos, foi incorporado 2,5 g L^{-1} de $NaNO_3$ aos **meios tratados**, e esses meios foram reutilizados em novos cultivos descontínuos em frascos Erlenmeyer (item 4.4.2.3.1) visando verificar o crescimento celular nos meios tratados, de modo que se pudesse obter as condições de tratamento do meio que maximizasse o crescimento celular quando o meio for reusado. No caso dos cultivos contínuos, o meio exaurido do FBR tubular passou continuamente por dois processos de filtração subsequentes, com membranas filtrantes de poliéster de diâmetros de 40 µm e 20 µm, seguidos de passagem por coluna de *CAG*, sendo recolhido e misturado com meio fresco nas proporções estabelecidas no item 4.4.2.1.4. Maiores detalhamentos são apresentados nos itens subsequentes.

4.4.2.1 *Ensaios e condições de experimentação*

Os planejamentos utilizados foram de tipo fatorial completo 2^3, rotacional, com cinco repetições do ponto central para verificar a reprodutibilidade dos resultados (Quadros 04 – 06). Os valores codificados do planejamento fatorial foram proporcionais aos valores reais das três variáveis independentes.

4.4.2.1.1 Tratamento com cloreto férrico e carvão ativado em pó

Os experimentos apresentados no Quadro 04, que visaram à otimização do tratamento do meio proveniente de cultivo descontínuo alimentado (item 4.4.1.1), são detalhados no item 4.4.2.2.1.1.

Quadro 04 – Planejamento experimental fatorial de tratamento com carvão ativado em pó (*CAP*) e cloreto férrico (*F*).

Experimento	Valores codificados			Valores reais		
	X_1[a]	X_2[b]	X_3[c]	*CAP* (mg L^{-1})	*F* (mg L^{-1})	*T* (min)
Parte A: Planejamento experimental inicial						
$CAPF_1$	-1	-1	-1	30,0	6,0	20,0
$CAPF_2$	1	-1	-1	50,0	6,0	20,0
$CAPF_3$	-1	1	-1	30,0	14,0	20,0
$CAPF_4$	1	1	-1	50,0	14,0	20,0
$CAPF_5$	-1	-1	1	30,0	6,0	40,0
$CAPF_6$	1	-1	1	50,0	6,0	40,0
$CAPF_7$	-1	1	1	30,0	14,0	40,0
$CAPF_8$	1	1	1	50,0	14,0	40,0
$CAPF_9$	-1,687	0	0	23,1	10,0	30,0
$CAPF_{10}$	1,687	0	0	56,9	10,0	30,0
$CAPF_{11}$	0	-1,687	0	40,0	3,3	30,0
$CAPF_{12}$	0	1,687	0	40,0	16,7	30,0
$CAPF_{13}$	0	0	-1,687	40,0	10,0	13,1
$CAPF_{14}$	0	0	1,687	40,0	10,0	46,9
$CAPF_{15}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0
$CAPF_{16}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0
$CAPF_{17}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0
$CAPF_{18}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0
$CAPF_{19}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0
Parte B: Confirmação da Otimização						
$CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$	-1,556	2,582	0,037	24,4	20,3	30,4
Parte C: Experimentos adicionais						
$CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$[d]	-	-	-	-	-	-
$CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$[e]	-	-	-	-	-	-

[a] Valores codificados de quantidade de carvão ativado em pó (*CAP*),
[b] Valores codificados de quantidade de cloreto férrico (*F*),
[c] Valores codificados de tempo de contato (*T*),
[d] Teste em meio padrão (2,5 g L^{-1} $NaNO_3$)
[e] Teste em meio exaurido, sem tratamento, com adição de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$.

4.4.2.1.2 Tratamento com sulfato férrico e carvão ativado em pó

Os experimentos apresentados no Quadro 05, que visaram à otimização do tratamento do meio proveniente de cultivo descontínuo alimentado (item 4.4.1.1), são detalhados no item 4.4.2.2.1.1.

Quadro 05 – Planejamento experimental fatorial de tratamento com carvão ativado em pó (*CAP*) e sulfato férrico (*S*).

Experimento	Valores codificados			Valores reais		
	X_1[a]	X_2[b]	X_3[c]	*CAP* (mg L^{-1})	*S* (mg L^{-1})	*T* (min)
Parte A: Planejamento experimental inicial						
$CAPS_1$	-1	-1	-1	30,0	15,0	20,0
$CAPS_2$	1	-1	-1	50,0	15,0	20,0
$CAPS_3$	-1	1	-1	30,0	35,0	20,0
$CAPS_4$	1	1	-1	50,0	35,0	20,0
$CAPS_5$	-1	-1	1	30,0	15,0	40,0
$CAPS_6$	1	-1	1	50,0	15,0	40,0
$CAPS_7$	-1	1	1	30,0	35,0	40,0
$CAPS_8$	1	1	1	50,0	35,0	40,0
$CAPS_9$	-1,687	0	0	23,1	25,0	30,0
$CAPS_{10}$	1,687	0	0	56,9	25,0	30,0
$CAPS_{11}$	0	-1,687	0	40,0	8,1	30,0
$CAPS_{12}$	0	1,687	0	40,0	41,9	30,0
$CAPS_{13}$	0	0	-1,687	40,0	25,0	13,1
$CAPS_{14}$	0	0	1,687	40,0	25,0	46,9
$CAPS_{15}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0
$CAPS_{16}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0
$CAPS_{17}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0
$CAPS_{18}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0
$CAPS_{19}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0
Parte B: Confirmação da Otimização						
$CAPS_{20}$-$CAPS_{22}$	0	0,775	0,614	40,0	32,8	36,1
Parte C: Experimentos adicionais						
$CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$[d]	-	-	-	-	-	-
$CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$[e]	-	-	-	-	-	-

[a] Valores codificados de quantidade de carvão ativado em pó (*CAP*),
[b] Valores codificados de quantidade de sulfato férrico (*F*),
[c] Valores codificados de tempo de contato (*T*),
[d] Teste em meio padrão (2,5 g L^{-1} $NaNO_3$),
[e] Teste em meio exaurido, sem tratamento, com adição de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$.

4.4.2.1.3 Tratamento com cloreto férrico e carvão ativado granulado

Os experimentos apresentados no Quadro 06, que visaram à otimização do tratamento do meio proveniente de cultivo descontínuo alimentado (item 4.4.1.1), são detalhados no item 4.4.2.2.1.2.

Quadro 06 – Planejamento experimental fatorial de tratamento com carvão ativado granulado (*CAG*) e cloreto férrico (*F*).

Experimento	Valores codificados			Valores reais		
	X_1[a]	X_2[b]	X_3[c]	*CAG* (g)	*F* (mg L^{-1})	*T* (min)
Parte A: Planejamento experimental inicial						
$CAGF_1$	-1	-1	-1	70,0	6,0	20,0
$CAGF_2$	1	-1	-1	130,0	6,0	20,0
$CAGF_3$	-1	1	-1	70,0	14,0	20,0
$CAGF_4$	1	1	-1	130,0	14,0	20,0
$CAGF_5$	-1	-1	1	70,0	6,0	40,0
$CAGF_6$	1	-1	1	130,0	6,0	40,0
$CAGF_7$	-1	1	1	70,0	14,0	40,0
$CAGF_8$	1	1	1	130,0	14,0	40,0
$CAGF_9$	-1,687	0	0	49,4	10,0	30,0
$CAGF_{10}$	1,687	0	0	150,6	10,0	30,0
$CAGF_{11}$	0	-1,687	0	100,0	3,3	30,0
$CAGF_{12}$	0	1,687	0	100,0	16,7	30,0
$CAGF_{13}$	0	0	-1,687	100,0	10,0	13,1
$CAGF_{14}$	0	0	1,687	100,0	10,0	46,9
$CAGF_{15}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0
$CAGF_{16}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0
$CAGF_{17}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0
$CAGF_{18}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0
$CAGF_{19}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0
Parte B: Expansão do planejamento inicial						
$CAGF_{20}$	0	0	3	50,0	10,0	60,0
$CAGF_{21}$	0	0	5	50,0	10,0	80,0
Parte C: Confirmação da Otimização						
$CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$	0,280	0	0,079	108,4	10,0	30,8

Continuação Quadro 06

Parte D: Experimentos adicionais							
$CAGF_{25}$ - $CAGF_{27}$ [d]	-	-	-	-	-	-	
$CAGF_{28}$ - $CAGF_{30}$ [e]	-	-	-	-	-	-	

[a] Valores codificados de quantidade de carvão ativado granulado (*CAG*),
[b] Valores codificados de quantidade de cloreto férrico (*F*),
[c] Valores codificados de tempo de residência (*T*),
[d] Teste em meio padrão (2,5 g L^{-1} $NaNO_3$),
[e] Teste em meio exaurido, sem tratamento, com adição de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$.

4.4.2.1.4 Tratamento contínuo com carvão ativado granulado

Os experimentos apresentados no Quadro 07, que visaram à otimização do tratamento do meio proveniente de cultivo contínuo (item 4.4.1.2), são detalhados no item 4.4.2.2.2 Como mencionado no item 4.4.1.2, todo experimento foi precedido de um cultivo de batelada alimentada, seguido por processo contínuo com uso exclusivo de meio fresco com ureia como fonte de nitrogênio e D = 0,6 h^{-1} até obtenção de regime permanente, de modo que, para todos os experimentos, a condição inicial (condição “a”) foi igual ($C_{1a} = C_{2a} = C_{3a} = C_{4a}$). Após esta condição, iniciou-se o reuso do meio tratado (item 4.4.2.2.2), com sua mistura ao meio fresco em diferentes proporções, com ou sem adição de ureia no meio tratado, denominado meio misto.

4.4.2.2 *Descrição dos tratamentos*

4.4.2.2.1 Meio proveniente do processo em batelada alimentada

4.4.2.2.1.1 *Cloreto ou sulfato férrico e carvão ativado em pó*

As condições mencionadas nos Quadros 04 e 05 foram aplicadas às amostras de meio de cultivo obtido após de cultivo de *A. platensis* em FBR tubular. A colheita da biomassa foi feita com filtração utilizando membrana de poliéster de 20 µm e, posteriormente, 2 L de meio exaurido foram utilizados em cada um dos tratamentos.

Quadro 07 – Experimentos de tratamento contínuo com carvão ativado granulado (*CAG*) em FBR tubulares.

Experimento	Condições	Meio tratado (%)	Meio fresco (%)	Ureia no meio tratado (mmol L^{-1})
EC_1	C_{1a}	-	100[a]	-
	C_{1b}	25	75[a]	0,0
	C_{1c}	25	75[a]	3,1
EC_2	C_{2a}	-	100[a]	-
	C_{2b}	50	50[a]	0,0
	C_{2c}	50	50[a]	3,1
EC_3	C_{3a}	-	100[a]	-
	C_{3b}	75	25[a]	0,0
	C_{3c}	75	25[a]	3,1
EC_4	C_{4a}	-	100[a]	-
	C_{4b}	90	10[a]	0,0
	C_{4c}	90	10[a]	3,1

[a]Concentração de ureia = 3,1 mmol L^{-1}

As quantidades de carvão ativado em pó (*CAP*) e cloreto férrico (*F*) (Quadro 04) ou sulfato férrico (Quadro 05) foram adicionadas no volume de meio exaurido a ser tratado e foram agitadas usando agitador magnético com velocidade de agitação de 100 rpm, segundo tempo (*T*) do planejamento experimental listado nas mesmas (Parte A). Após otimização das condições experimentais, três experimentos de confirmação listados na parte B dos Quadros 04 e 05 ($ECAPF_{20}$-$ECAPF_{22}$ e $ECAPS_{20}$-$ECAPS_{22}$, respectivamente) foram realizados para confirmação da validade do modelo matemático que descreve o processo. Foram realizados experimentos adicionais, com o intuito de comparação com os dados experimentais obtidos em condições ótimas dos meios tratados. Os experimentos adicionais descritos na parte C dos Quadros 04 e 05 incluem os experimentos $CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$ e $CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$, respectivamente, utilizando meio de cultivo padrão, bem como os experimentos $CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$ e $CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$, reutilizando meio exaurido sem tratamento prévio, porém, com adição de $NaNO_3$ na concentração do meio de cultivo padrão (2,5 g L^{-1}).

4.4.2.2.1.2 *Cloreto férrico e carvão ativado granulado*

As condições mencionadas no Quadro 06 foram aplicadas às amostras de meio de cultivo obtido após de cultivo de *A. platensis* em FBR tubular utilizando ureia como fonte de nitrogênio. A colheita da biomassa foi feita com filtração utilizando membrana de poliéster de 20 µm e, posteriormente, 2 L de meio exaurido foram utilizados em cada tratamento. As quantidades de cloreto férrico (*F*) foram adicionadas no volume de meio a ser tratado e foram agitadas usando agitador magnético com velocidade de agitação de 100 rpm durante 10 min. Posteriormente, dito meio foi colocado numa coluna de vidro de 32 mm de diâmetro interno preenchida com diferentes quantidades de carvão ativado granulado (*CAG*) e durante tempo de residência (*T*) segundo planejamento experimental listado no Quadro 06, parte A ($CAGF_1$-$CAGF_{19}$). Neste caso, foi necessária a expansão de planejamento experimental, acrescentando-se os dois experimentos da parte B do Quadro 06 ($CAGF_{20}$ e $CAGF_{21}$) para adequar as condições de tratamento com vistas à otimização do crescimento celular no meio tratado. Adicionalmente, como no sub-item anterior, foram feitos experimentos de confirmação das condições do ponto ótimo de tratamento (Parte C, $CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$) determinadas pela regressão multivariável, bem como experimentos adicionais (Parte D) com meio padrão ($CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$) e com meio exaurido não tratado ($CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$).

4.4.2.2.2 Meio proveniente de processo contínuo

Como comentado anteriormente, foram avaliadas diferentes condições de adição de meio: a primeira condição de estado estacionário (C_a), com meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia; a segunda e terceira, utilizaram meio misto, sem (C_b) e com (C_c) adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia, respectivamente. A condição de estado estacionário foi considerada quando a concentração celular foi mantida constante pelo menos por dois tempos de residência. Após ter sido atingido o estado estacionário em cada condição avaliada, a nova condição de adição de meio foi aplicada.

Durante a primeira condição de estado estacionário e durante o processo contínuo com meio misto, a suspensão celular foi continuamente filtrada utilizando uma sequencia de duas membranas de 40 µm e 20 µm para colheita da *A. platensis*

e a biomassa foi removida de tempos em tempos. A fração líquida resultante, denominada meio exaurido, foi tratada utilizando uma coluna de 32 mm de diâmetro interno preenchida com 100 g de *CAG*, sendo o tempo de residência de 2 h. Uma quantidade de meio tratado foi estocada e as proporções apropriadas de meio tratado foram misturadas com meio fresco produzindo o meio misto, sem (C_b) e com (C_c) adição de ureia (Quadro 07), que foi utilizado para alimentar o processo contínuo de cultivo. O diagrama do processo está apresentado na Figura 04.

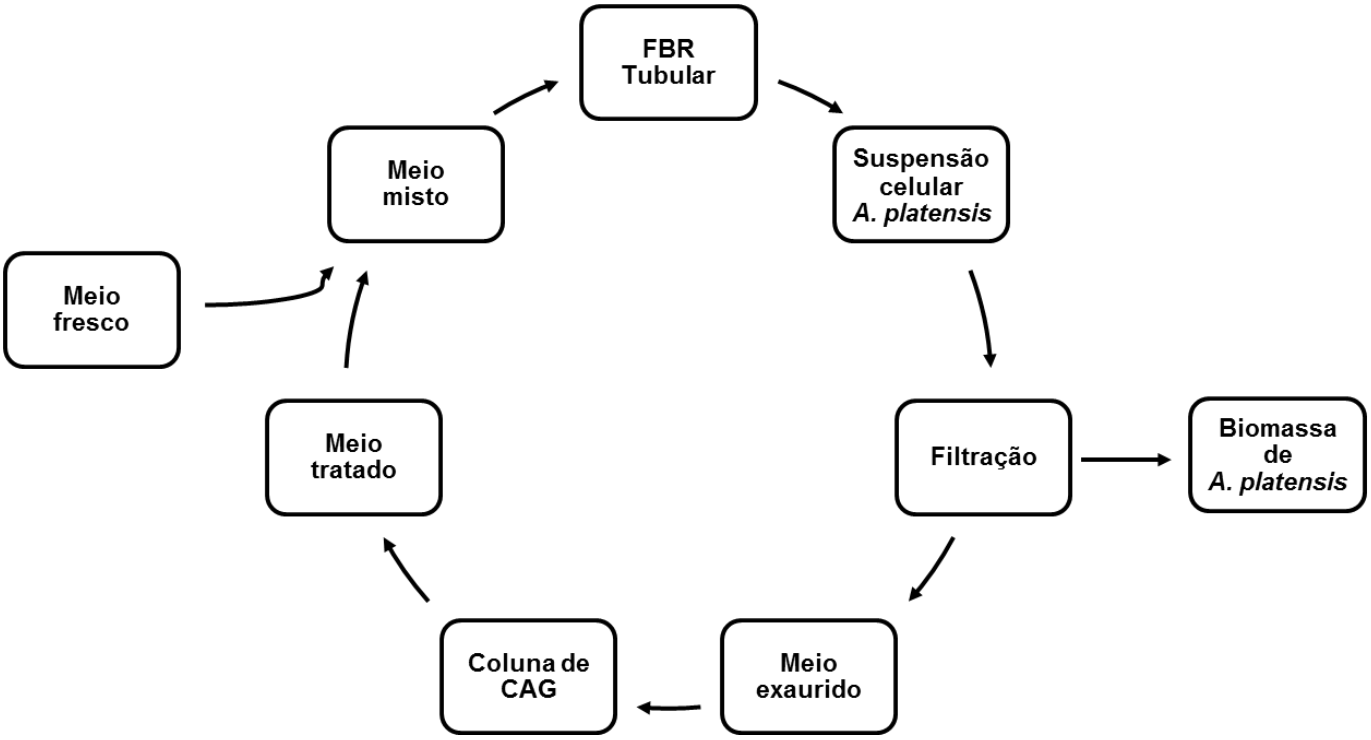

Figura 04 – Diagrama esquemático de cultivo contínuo de *A. platensis* com meio tratado.

4.4.2.3 *Cultivo de A. platensis em meios tratados*

4.4.2.3.1 Cultivo em meio proveniente do processo em batelada alimentada

4.4.2.3.1.1 *Cultivo em frascos Erlenmeyer*

Depois dos tratamentos listados, tendo em vista a exaustão de nitrogênio no meio, adicionou-se uma quantidade fixa de 2,5 g L^{-1} de $NaNO_3$ para repor a fonte de

nitrogênio do meio de cultivo. O valor de pH foi restabelecido em 9,5 ± 0,1 através da adição de CO_2 proveniente de cilindro. *A. platensis* foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 0,5 L sendo o volume de cultivo de 0,2 L de meio tratado em concentração celular de 50 mg L^{-1}. O valor de pH foi mantido em 9,5 ± 0,5, com uso de CO_2 proveniente de cilindro. Os cultivos foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm. A intensidade luminosa foi mantida em 120 µmol fótons m^{-2} s^{-1} usando lâmpadas fluorescentes super luz do dia e medidor de intensidade luminosa LICOR LI-250A (Lincoln, NE). A temperatura foi mantida em 30 ± 1 °C.

Durante os cultivos foram acompanhados os diversos parâmetros avaliados neste trabalho, conforme as técnicas analíticas a serem descritas no item 4.4.3. Ao final do cultivo, caracterizado pela estabilização do crescimento celular, a suspensão de *A. platensis* foi filtrada, lavada três vezes com água destilada, necessária para a retirada do sal adsorvido às células. Após a secagem com ventilação a 55 ºC por 12 horas (PELIZER et al., 2003), a massa de cianobactérias foi triturada, e seguiu para as análises finais.

4.4.2.3.1.2 <u>*Cultivo em fotobiorreatores tubulares*</u>

Após a otimização dos tratamentos em frascos Erlenmeyer de 0,5 L mencionados no item anterior, os meios tratados nas condições de otimização dos três tratamentos do meio proveniente de cultivo descontínuo alimentado utilizando: a) carvão ativado em pó (*CAP*) com cloreto férrico (*F*); b) carvão ativado em pó (*CAP*) com sulfato férrico (*S*) e c) carvão ativado granulado (*CAG*) com cloreto férrico (*F*), descritos na parte B dos Quadros 04, 05 e na parte C do Quadro 06, respectivamente, foram utilizados em cultivos em FBR tubulares descritos no item 4.4.1.1. Adicionou-se uma quantidade fixa de 2,5 g L^{-1} de $NaNO_3$ para repor a fonte de nitrogênio no meio de cultivo tratado. O valor de pH foi restabelecido em 9,5 ± 0,1 através da adição de CO_2 proveniente de cilindro. *A. platensis* foi inoculada em FBR tubulares contendo 3,5 L meio tratado em concentração de 400 mg L^{-1}. A intensidade luminosa foi mantida em 120 µmol fótons m^{-2} s^{-1} usando lâmpadas fluorescentes super luz do dia e medidor de intensidade luminosa LICOR LI-250A (Lincoln, NE). A temperatura foi mantida em 32 ± 1 °C. Ao longo do cultivo o valor de pH foi mantido em 9,5 ± 0,5, com uso de CO_2 proveniente de cilindro.

Durante os cultivos foram acompanhados os diversos parâmetros avaliados neste trabalho, conforme as técnicas analíticas a serem descritas no item 4.4.3. Ao final do cultivo, caracterizado pela estabilização do crescimento celular, a suspensão de *A. platensis* foi filtrada e lavada três vezes com água destilada para a retirada do sal adsorvido às células. Após a secagem com ventilação a 55 ºC por 12 horas (PELIZER et al., 2003), a massa de cianobactérias foi triturada, e seguiu para as análises finais.

4.4.2.3.2 Cultivo em meio proveniente do processo contínuo

A Figura 04 mostra que o meio tratado em processo contínuo foi reaproveitado como indicado no item 4.4.1.2. Na Figura 05 apresentam-se os FBR tubulares utilizados nesses processos contínuos descritos no item anterior.

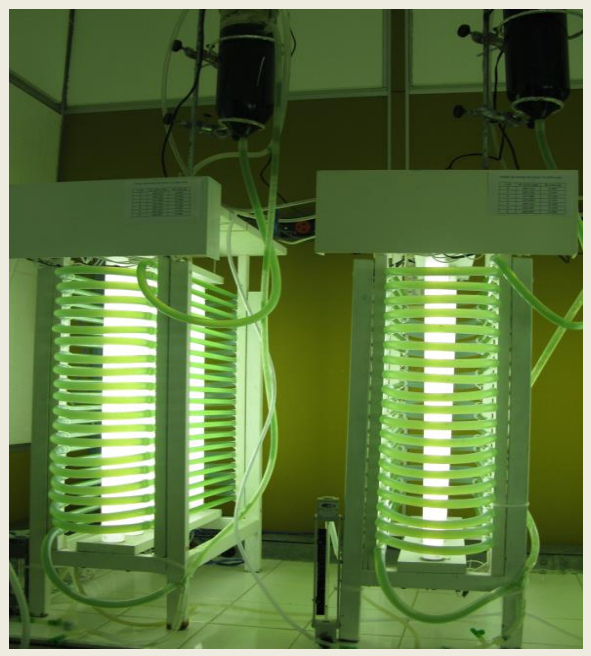

Figura 05 – Fotobiorreatores tubulares utilizados nos experimentos contínuos.

4.4.3 Técnicas analíticas

4.4.3.1 *Remoção de absorbância nos meios tratados*

As avaliações das remoções de matéria orgânica e de pigmentos dos meios que sofreram os tratamentos físico-químicos para seus reusos foi realizada medindo absorbância das amostras em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLµS), em

comprimentos de onda de 254 nm (KABSCH-KORBUTOWICZ, 2005) e 440 nm (FERRARI; TASSAN, 1999), correspondentes a A_{254} e A_{440}, respectivamente.

4.4.3.2 *Acompanhamento do cultivo*

4.4.3.2.1 Concentração celular

A concentração celular foi determinada por turbidimetria, conforme descrito por Leduy e Therien (1977). Foram utilizadas amostras de 5 mL de meio contendo células retiradas após a homogeneização dos tanques. Essas amostras, diluídas quando necessário, foram analisadas em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLμS), em comprimento de onda de 560 nm. Os valores foram expressos em massa seca de biomassa por volume de suspensão celular utilizando curva de calibração.

4.4.3.2.2 Concentração de amônia total

A concentração de amônia total foi determinada por potenciometria, conforme descrito por Carvalho et al. (2004), através de potenciômetro (ORION 710A) e de eletrodo seletivo para amônia (ORION 95-12). O volume de amostra utilizado foi de 10 mL de meio isento de células.

Foi necessária a alcalinização prévia das amostras, e para tal foi utilizada solução de NaOH 1,5 N, em quantidade suficiente para o aumento do valor do pH das amostras para cerca de 13,0. Em tal valor de potencial hidrogeniônico, a forma amoniacal se apresenta totalmente como amônia, conforme o equilíbrio químico: $NH_4^+ + OH^- \leftrightarrow NH_3 + H_2O$. A conversão de íons amônio em amônia é essencial, uma vez que a membrana do eletrodo é permeável apenas a esta última.

4.4.3.2.3 Concentração de nitrato

A concentração de nitrato foi determinada conforme a metodologia descrita por trabalho anterior (RODRIGUES et al., 2010), que por sua vez foi baseado em Vogel (2002), metodologia esta que inclui passagens de redução, destilação e titulação. Foram utilizados 10 mL de meio isento de células para a análise.

Os íons nitrato presentes na amostra foram reduzidos à amônia pela presença dos metais da liga de Devarda (50 % cobre, 45 % alumínio e 5 % zinco) em meio alcalino forte (solução de NaOH 0,50 N). A seguinte equação química ilustra essa redução: $3\ NO_3^- + 8\ Al + 5\ OH^- + 2\ H_2O \leftrightarrow 8\ AlO_2^- + 3\ NH_3$. A destilação permite a captura da amônia formada em solução padronizada de HCl 0,20 N, e a quantificação da amônia é feita através da titulação do excesso de ácido com solução padronizada de NaOH 0,20 N, na presença de indicador vermelho de metila. A conversão de volume de ácido titulado (mililitros) em massa de íons nitrato (gramas) foi baseada na informação de que 1 mL de ácido clorídrico 1,00 N corresponde a 0,06201 g de íons nitrato (VOGEL, 2002).

4.4.3.2.4 Concentração de carbonato total

A concentração de carbonato foi determinada por titulometria, conforme descrito por Pierce e Haenisch (1948). Foram utilizados 10 mL de meio isento de células para a análise. Às amostras foi adicionado NaOH 1,5 N, pois na presença de base ocorre a conversão dos íons hidrogenocarbonato em íons carbonato (Equacão 01). A solução foi titulada com HCl 0,50 N na presença de indicador fenolftaleína; em meio ácido, a conversão é inversa: os íons carbonato são convertidos em íons hidrogenocarbonato (Equacão 02). Uma segunda titulação foi realizada então, utilizando a mesma solução ácida, porém na presença de indicador alaranjado de metila; em meio ácido em excesso, os íons hidrogenocarbonato formados acabam por ser convertidos em ácido carbônico, por reação de deslocamento de equilíbrio (Equacão 03).

$NaOH + NaHCO_3 \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O$ (Equação 01),

$Na_2CO_3 + HCl \rightarrow NaHCO_3 + NaCl$ (Equação 02),

$NaHCO_3 + HCl \rightarrow H_2CO_3 + NaCl$ (Equação 03).

O cálculo da concentração de íons carbonato é baseado na diferença entre os volumes medidos nas duas titulações, considerando os valores de normalidade tanto do ácido quanto do sal.

4.4.3.2.5 Determinação do pH

Os valores de pH foram acompanhados através de potenciômetro (METTLER TOLEDO 2100E). O eletrodo (METTLER TOLEDO) utilizado nas medições foi calibrado conforme as instruções do fabricante, em relação à exatidão e precisão, sempre anteriormente a uma leitura individual ou a uma série de leituras consecutivas. As leituras de pH foram realizadas através da imersão direta dos eletrodos nos tanques de cultivo.

O valor de pH foi fixado em 9,5 ± 0,5, de acordo com trabalho de SANCHEZ-LUNA et al. (2007), valor este mantido pela adição diária de CO_2 proveniente de cilindro.

4.4.3.3 *Avaliação da biomassa*

Ao final do cultivo, a suspensão celular de *A. platensis* foi filtrada e posteriormente, utilizaram-se três lavagens sucessivas com 500 mL de água destilada para retirada dos sais adsorvidos às células, e, após secagem em estufa com ar circulante a 55 °C por 12 horas (PELIZER et al., 2003), foi avaliado o teor de lipídeos e proteínas da biomassa.

4.4.3.3.1 Teor de proteínas

O conteúdo protéico total na biomassa seca (*PTN*) foi determinado pelo clássico método de micro-Kjeldahl, adotando-se o fator de 6,25 para a conversão a partir dos teores de nitrogênio total (AOAC, 1984). As amostras desengorduradas, provenientes da etapa da determinação de lipídeos, foram trituradas novamente e submetidas a aquecimento intenso, na presença de H_2SO_4 concentrado e de catalisador. Tal procedimento promove a destruição da matéria orgânica e formação de nitrogênio inorgânico, na forma de $(NH_4)_2SO_4$. A alcalinização deste resíduo, durante uma etapa de destilação do nitrogênio, promove a conversão do sal em amônia, recolhida em solução saturada de HBO_3. A titulação desta solução com HCl 0,020 N padrão permite a determinação da concentração de nitrogênio na amostra utilizada.

4.4.3.3.2 Teor de lipídeos

O teor lipídico total na biomassa seca foi determinado de acordo com Olguín et al. (2001). Amostras trituradas foram submetidas à extração da fração lipídica por solvente orgânico (clorofórmio 2: metanol 1), em extrator contínuo de Soxhlet. Os resíduos lipídicos, juntamente aos solventes, foram então submetidos a tratamento em sistema evaporador rotativo a vácuo, para eliminação destes últimos. Os valores em massa de lipídeos foram calculados com base na diferença de massa do balão de fundo redondo utilizado, antes e depois do procedimento.

4.4.3.3.3 Teor de clorofila-a

A análise de clorofila-a foi realizada por espectrofotometria, conforme a metodologia descrita por Vonshak (1997), na amostra correspondente à máxima concentração celular obtida. O volume de amostra utilizado para análise foi de 5 mL de meio contendo células. As células foram extraídas das amostras liquidas através de filtração a vácuo, e submetidas a processo de extração do pigmento com metanol, a 70 °C, e filtração com membranas de politetrafluoretileno com porosidade de 1,0 µm (MILLIPORE). Diluições alcoólicas das soluções resultantes foram preparadas e submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro (FEMTO 700 PLµS), em comprimento de onda de 665 nm.

Para obtenção dos resultados foi construída uma curva de calibração que correlaciona os valores de absorbância com um determinado valor de concentração de clorofila-a, em miligramas por litro de suspensão celular.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os valores de absorbância (A_{254} e A_{440}) foram utilizados no cálculo da remoção de absorbância (RA_{254} e RA_{440}, respectivamente). Com os valores obtidos de concentração celular máxima nos cultivos (X_m), foram calculados os parâmetros produtividade em células (P_X), conteúdo de clorofila-a da biomassa (*Chl*), bem como os outros parâmetros dependentes destas variáveis. Os resultados experimentais foram avaliados por regressão multivariável ou análise de variância, conforme o planejamento experimental adotado.

5.1 *Cálculo de parâmetros*

5.1.1 Remoção da A_{254} (RA_{254}) e A_{440} (RA_{440})

A remoção foi calculada utilizando a equação geral:

$$RA = \left(\frac{A_{BT} - A_{AT}}{A_{BT}} \right) * 100 \qquad \text{(Equação 04)}$$

Sendo A_{BT} = Absorbância do meio antes do tratamento e A_{AT} = Absorbância do meio após do tratamento. Nos processos contínuos, os valores de A_{BT} e A_{AT} correspondem aos valores de absorbância dos meios exaurido e tratado, respectivamente (Figura 04).

A leitura da Absorbância da amostra de luz ultravioleta (254 nm) (KABSCH-KORBUTOWICZ, 2005) permite uma avaliação indireta da remoção de carbono orgânico total das amostras a serem reaproveitadas. Andrade Jr. (2004), explica que a determinação da absorbância A_{254} tem por base a capacidade da matéria orgânica de absorver luz UV nesse comprimento de onda e que esta determinação é adequada para monitorar mudanças na concentração de MO em águas.

A leitura da Absorbância da amostra de luz visível (440 nm) (FERRARI; TASSAN, 1999) é utilizada devido a que nesse comprimento de onda, o material proveniente de algas atinge o máximo valor de absorção. Neste comprimento de onda, a clorofila-a, principal pigmento fotossintético dos micro-organismos fotossintetizantes, absorve maior quantidade de luz, sendo assim, o valor determinado para avaliar a remoção de pigmentos pelos diferentes tratamentos aplicados.

5.1.2 Parâmetros cinéticos

Os valores de X_m, em miligramas por litro (base seca), correspondem aos valores de concentração celular máxima dos cultivos em batelada e batelada alimentada. Os valores de X_S, em miligramas por litro (base seca), correspondem aos valores de concentração celular no estado estacionário dos cultivos em processo contínuo.

Os valores de P_X, em miligramas por litro por dia, representam a média de crescimento celular diário, e foram determinados com base na concentração total de células formadas e no tempo total de cultivo (T_c) (Equacão 05).

$$P_X = \frac{(X_m - X_o)}{T_c} \qquad \text{(Equação 05)}$$

onde X_o foi a concentração celular inicial dos cultivos.

O teor de clorofila-a na biomassa (*Chl*), em miligramas por grama de biomassa, foi calculado como a relação entre a concentração de clorofila-a no final do cultivo na suspensão celular (Chl-a) e sua concentração celular máxima (X_m), de acordo com a Equação 06.

$$Chl = \frac{(\text{Chl-a} \times 1000)}{X_m} \qquad \text{(Equação 06)}$$

A produtividade de clorofila-a (P_{Chl}), em miligramas por litro por dia, foi determinada com ajuda da Equação 07.

$$P_{Chl} = \frac{Chl \times P_X}{1000} \qquad \text{(Equação 07)}$$

5.2 *Análise estatística*

5.2.1 Meio proveniente do processo em batelada alimentada

Os parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl*, *PTN*, P_X e P_{Chl} dos cultivos realizados nos meios reaproveitados, após os tratamentos listados nos Quadros 04 – 06, correspondentes aos planejamentos experimentais utilizados, foram avaliados por regressão multivariável, com o objetivo de facilitar a compreensão da influência das variáveis independentes em estudo nas respostas de interesse (variáveis dependentes).

As variáveis resposta (Y_i) foram colocadas em modelos de segunda ordem ao respeito das variáveis independentes, segundo a equação geral:

$$Y_i = a_i + \sum_j b_{ij} X_j + \sum_j c_{ij} X_j^2 + \sum_j d_{ijj'} X_j X_{j'} \qquad \text{(Equação 08)}$$

Sendo $Y_1 = RA_{254}$, $Y_2 = RA_{440}$, $Y_3 = X_m$, $Y_4 = Chl$, $Y_5 = PTN$ e $Y_6 = P_X$ como conseqüência das variações dos valores codificados (X_1, X_2 e X_3) das variáveis independentes de cada tratamento.

Nesta equação, *i* e *j* representam as variáveis dependente e independente, respectivamente, *j'* indica as suas interações; a_i é o intercepto, b_{ij} são os coeficientes lineares, c_{ij} os coeficientes quadráticos e $d_{ijj'}$ as interações. As análises de regressão multivariáveis e as análises de variância foram feitas no S-PLUS 2000. Os valores reais e os valores codificados das variáveis foram utilizados na regressão (NIKEREL et al., 2005).

Para a análise estatística, foram testados modelos quadráticos e lineares. Junto às análises que foram realizadas, encontram-se os chamados níveis descritivos (*P*), que indicam os erros. Na análise de regressão, os valores de *P* indicam o menor erro em que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente tem influência na determinação do parâmetro estimado. Em outras palavras, testando o coeficiente correspondente a uma variável independente é possível verificar se esta tem importância na determinação do parâmetro estimado. Na análise de variância da regressão, por sua vez, o valor de *P* indica se houve um bom ajuste da equação obtida através da regressão, ou seja, se a regressão realizada foi satisfatória. As regressões foram aceitas somente se a análise de variância da regressão apresentou um valor de $P < 0{,}050$.

5.2.2 Meio proveniente do processo contínuo

MANOVA e teste de Tukey foram utilizados na análise das médias de RA_{254}, RA_{440}, X_S, P_X, *PTN*, dos experimentos do Quadro 07 nas condições explicadas no item 4.4.2.2.2.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é dividido em 5 sub-capítulos principais, que envolvem os tratamentos de meios provenientes de processo descontínuo alimentado ou contínuo, bem como o crescimento da *A. platensis* em cada um desses meios. No caso dos meios tratados provenientes de processo descontínuo alimentado, adotou-se um planejamento experimental que permitiu a otimização do tratamento visando seu reuso em novos cultivos da mesma cianobactéria.

Dessa forma, nos itens 6.1 a 6.3 são apresentados os resultados das correspondentes otimizações nos meios tratados provenientes de processo descontínuo alimentado, que foram adicionados de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$ e posteriormente reusados em cultivos de *A. platensis* em frascos Erlenmeyer. Considerando que a demanda de nutrientes é maior nos cultivos realizados em FBR tubulares quando comparados a cultivos em frascos Erlenmeyer, no item 6.4 são descritos os experimentos nesses FBR, em condições otimizadas de reuso de meio encontradas para os experimentos em frascos Erlenmeyer. Dessa forma, é possível verificar se as conclusões obtidas para frascos Erlenmeyer poderiam ser estendidas para cultivos em FBR tubulares.

Finalizando, no item 6.5 são apresentados os resultados e discussão no que concerne ao processo contínuo de cultivo de *A. platensis* com remoção celular e tratamento simultâneo do meio exaurido do FBR em coluna com carvão ativado granulado, sob diferentes proporções de reuso de meio tratado.

6.1 *Otimizacão das condições de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado com uso de cloreto férrico e carvão ativado em pó*

6.1.1 Remoção de matéria orgânica e pigmentos

No presente trabalho que visa à reutilização de meio de cultivo, a presença de MO pode levar a um aumento da turbidez do meio, levando ao sombreamento, que pode reduzir o crescimento da cianobactéria. Igualmente, a presença de pigmentos, especialmente clorofila-a, no meio após a sua utilização, interfere na captação de luz pelo micro-organismo.

Na Tabela 01 são apresentados os valores de remoção de absorbância (RA_{254} e RA_{440}) nos diferentes tratamentos realizados segundo planejamento experimental adotado nesta parte do trabalho. Os processos de adsorção/floculação utilizados em combinação permitiram o sucesso na remoção de MO (78 – 97 %) e de clorofila-a (74 – 93 %). Os melhores valores de remoção (RA_{254} e RA_{440}) foram atingidos nos testes de confirmação da otimização, $CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$ (92,3 ± 0,6 % e 95,3 ± 0,6 %, respectivamente). Esses resultados têm a mesma ordem de grandeza do que os reportados por Odegaard (1979), que obtiveram remoção de sólidos suspensos entre 95 % e 98 % em águas residuárias. Ainda segundo o referido autor, a maioria dos contaminantes presentes em águas residuárias está constituída por partículas sólidas ou estão associadas a elas.

Apesar da pouca informação existente sobre tratamentos físico-químicos aplicados no reuso de meios de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, foi demonstrado que a combinação dos processos de adsorção e floculação, além da sua aplicabilidade em água, pode ser utilizada em tratamentos de meios para serem reaproveitados em novos cultivos de *A. platensis* (Tabela 01). Isso é possível, uma vez que a floculação aglomera MO que se encontra em suspensão (ou em estado coloidal) e MO que se encontra dissolvida, em partículas maiores que possam ser removidas posteriormente mediante a sua adsorção em partículas de *CAP*.

Tabela 01 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados com carvão ativado em pó e cloreto férrico segundo planejamento experimental.

Experimento	Valores codificados			Valores reais			RA_{254}[d]	RA_{440}[e]	X_m[f]	Chl-a[g]	PTN[h]	LIP[i]	P_X[j]	Chl[k]
	X_1[a]	X_2[b]	X_3[c]	CAP (mg L^{-1})	F (mg L^{-1})	T (min)	(%)	(%)	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	(%)	(%)	(mg L^{-1} d^{-1})	(mg g^{-1})
Parte A: Planejamento experimental inicial														
$CAPF_1$	-1	-1	-1	30,0	6,0	20,0	82	86	4008	70,4	27,6	7,4	565	17,6
$CAPF_2$	1	-1	-1	50,0	6,0	20,0	83	87	4105	77,1	28,5	6,7	579	18,8
$CAPF_3$	-1	1	-1	30,0	14,0	20,0	82	85	3700	65,6	27,1	8,2	521	17,7
$CAPF_4$	1	1	-1	50,0	14,0	20,0	81	85	3755	65,1	27,1	7,1	529	17,3
$CAPF_5$	-1	-1	1	30,0	6,0	40,0	87	91	4430	84,5	29,9	8,0	626	19,1
$CAPF_6$	1	-1	1	50,0	6,0	40,0	90	94	4630	100,5	32,6	6,5	654	21,7
$CAPF_7$	-1	1	1	30,0	14,0	40,0	92	96	4967	138,5	34,6	7,4	702	27,9
$CAPF_8$	1	1	1	50,0	14,0	40,0	91	95	4732	126,7	32,3	7,3	669	26,8
$CAPF_9$	-1,687	0	0	23,1	10,0	30,0	90	95	4760	122,9	31,8	6,9	673	25,8
$CAPF_{10}$	1,687	0	0	56,9	10,0	30,0	90	94	4640	101,3	29,7	7,5	656	21,8
$CAPF_{11}$	0	-1,687	0	40,0	3,3	30,0	88	92	4510	95,0	31,7	6,6	637	21,1
$CAPF_{12}$	0	1,687	0	40,0	16,7	30,0	93	97	5008	157,8	36,2	6,9	708	31,5
$CAPF_{13}$	0	0	-1,687	40,0	10,0	13,1	74	78	3326	54,4	25,1	8,4	468	16,4
$CAPF_{14}$	0	0	1,687	40,0	10,0	46,9	91	95	4710	112,9	33,3	8,0	666	24,0
$CAPF_{15}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0	91	95	4731	121,2	31,7	7,3	669	25,6
$CAPF_{16}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0	91	95	4750	117,4	33,1	7,9	671	24,7
$CAPF_{17}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0	91	95	4723	115,6	31,2	7,3	668	24,5
$CAPF_{18}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0	91	95	4698	120,5	32,3	7,5	664	25,6
$CAPF_{19}$	0	0	0	40,0	10,0	30,0	91	95	4765	122,7	32,6	7,4	674	25,8

Continuacão Tabela 01

Parte B: Confirmação da Otimização														
$CAPF_{20}$	-1,556	2,582	0,037	24,4	20,3	30,4	93	96	4931	120,4	35,7	7,8	697	24,4
$CAPF_{21}$	-1,556	2,582	0,037	24,4	20,3	30,4	92	95	4879	117,9	36,8	7,7	690	24,2
$CAPF_{22}$	-1,556	2,582	0,037	24,4	20,3	30,4	92	95	4870	118,7	35,8	7,9	689	24,4
Parte C: Experimentos adicionais														
$CAPF_{23}^{l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2130	33,7	26,8	6,5	297	15,8
$CAPF_{24}^{l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2085	32,4	25,7	7,0	291	15,5
$CAPF_{25}^{l}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2040	32,8	25,0	7,0	284	16,1
$CAPF_{26}^{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2152	36,9	24,4	8,0	300	17,1
$CAPF_{27}^{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2343	35,7	24,3	8,0	328	15,2
$CAPF_{28}^{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2029	37,2	25,1	8,0	283	18,3

[a] Valores codificados de quantidade de carvão ativado em pó (*CAP*)
[b] Valores codificados de quantidade de cloreto férrico (*F*)
[c] Valores codificados de tempo de contato (*T*)
[d] Remoção de absorbância em comprimento de onda 254 nm
[e] Remoção de absorbância em comprimento de onda 440 nm
[f] Concentração máxima de biomassa
[g] Concentração de clorofila-a na suspensão celular
[h] Conteúdo total de proteínas na biomassa seca
[i] Conteúdo total de lipídeos na biomassa seca
[j] Produtividade celular
[k] Conteúdo de clorofila-a na biomassa seca
[l] Teste em meio padrão (SCHLÖSSER, 1982) com 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$
[m] Teste em meio exaurido após cultivo em batelada, sem tratamento prévio, com reposição de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$

6.1.2 Crescimento celular em meios tratados

A Tabela 01 mostra os resultados de crescimento celular de *A. platensis* nos meios após seus respectivos tratamentos, bem como os testes adicionais com meios não tratados. Todos os cultivos foram realizados em frascos Erlenmeyer, conforme descrito no item 4.4.2.3.1. Os valores de X_m dos testes $CAPF_1$-$CAPF_{19}$ (Tabela 01, parte A) são 60 a 140 % maiores do que o valor médio dos testes realizados com meio padrão, $CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$ (2085 ± 45 mg L^{-1}), e são 53 a 130 % maiores do que o valor médio dos testes realizados em meio reaproveitado sem tratamento, $CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$ (2175 ± 158 mg L^{-1}). Adicionalmente, o valor médio de X_m (4733 ± 26 mg L^{-1}) dos experimentos correspondentes ao ponto central do planejamento experimental ($CAPF_{15}$-$CAPF_{19}$) é 127 e 118 % maior do que os valores médios de X_m dos testes realizados com meio padrão ($CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$) e meio reaproveitado sem tratamento ($CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$), respectivamente. Igualmente, o valor médio de X_m (4893 ± 33 mg L^{-1}) dos experimentos correspondentes à confirmação da otimização ($CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$) é 135 e 125 % maior do que os valores médios de X_m dos testes realizados com meio padrão ($CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$) e meio reaproveitado sem tratamento ($CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$), respectivamente. Esses resultados indicam a influência da remoção da MO no crescimento de *A. platensis* em meio reaproveitado após condições ótimas de *CAP*, *F* e *T*, bem como a validade da metodologia aplicada neste trabalho.

Por outro lado, pode se inferir que o crescimento de *A. platensis* poderia ter sido influenciado pela presença de ferro residual nos meios tratados. Este estudo foi apresentado na forma de pôster no 27° CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA (MOROCHO-JÁCOME; CARVALHO, 2013a) e está sendo atualmente avaliado comparando com os resultados com Boyd et al. (2000) que foram os pioneiros em realizar experimentos no Oceano Austral estimulando o crescimento de microalgas mediante fertilização com ferro.

O Gráfico 01 demonstra que as curvas de crescimento em condições ótimas de tratamento têm maiores valores de crescimento celular do que as curvas nos experimentos de controle, desde o começo dos experimentos. Mesmo assim, é evidente a ausência de fase lag nos experimentos realizados, devido às condições similares durante o preparo do inóculo e os cultivos, uma vez que as células utilizadas no inóculo foram utilizadas quando estavam em fase log de crescimento, sendo utilizado $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio.

Como os cultivos não foram limitados por carbono, as condições de tratamento do meio exaurido que possibilitaram maior crescimento celular levaram a concentrações finais de nitrato muito baixas (0,004 – 0,08 g L^{-1}).

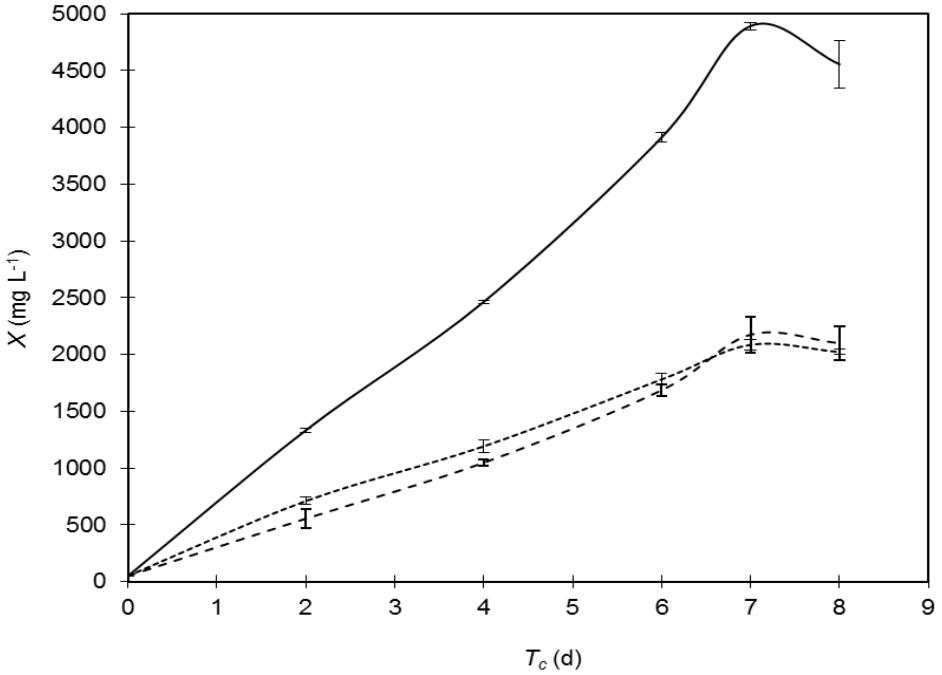

Gráfico 01 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados. $CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$: Confirmação da Otimização (*CAP* = 24,4 mg L^{-1}, *F* = 20,3 mg L^{-1}, *T* = 30,4 min) (—), $CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$: Meio padrão Schlösser (·····), $CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$: Meio exaurido sem tratamento (---), barras de erro correspondem ao desvio padrão.

Como é bem conhecido, o consumo de bicarbonato de sódio leva a um aumento e pH do meio de cultivo. Adicionalmente, embora em menor proporção, a captação de nitrato pela *A. platensis* para sua redução até amônia, também contribui com o incremento do pH durante o crescimento. Assim, nos experimentos com meio tratado para ser reaproveitado, pH foi mantido em valores de 9,5 ± 0,2 pela adição de CO_2 de cilindro, como pode se visualizar no Gráfico 02, que mostra a variação de pH durante o crescimento de *A. platensis* no teste de confirmação da otimização ($CAPF_{20}$). Nestas condições de pH, *A. platensis* utiliza amônia preferencialmente em lugar de nitrato e a amônia ingressa na célula por difusão, e é captada diretamente sem consumo de energia (BELKIN; BOUSSIBA, 1991).

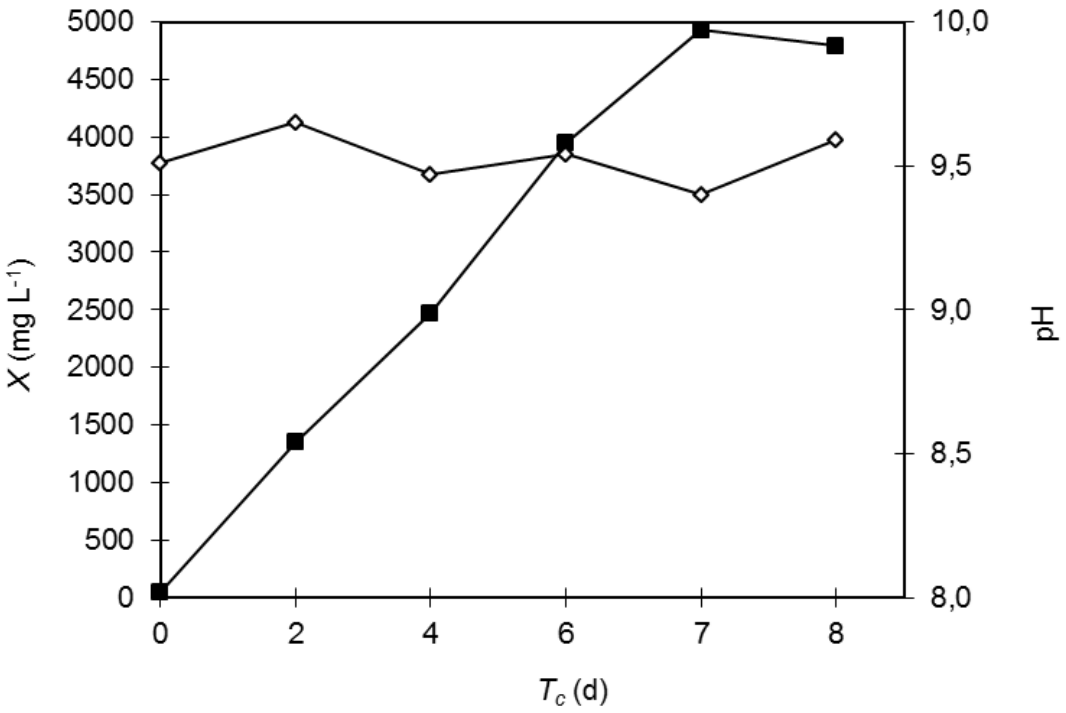

Gráfico 02 – Concentração celular (■) e valores de pH (◊) no experimento de Confirmação da Otimização, $CAPF_{20}$ (*CAP* = 24,4 mg L^{-1}, *F* = 20,3 mg L^{-1}, *T* = 30,4 min).

Como comentado anteriormente, após o tratamento dos meios foi adicionado $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio, no começo dos experimentos de reaproveitamento, em quantidades fixas segundo meio padrão (2,5 g L^{-1}). O $NaNO_3$ adicionado em batelada no início dos cultivos permitiu uma reserva na forma de nitrato, que reduzido, através da ação das enzimas nitrato e nitrito redutases, quando necessário, impediu qualquer tipo de carência dessa fonte para as células como foi reportado por Rodrigues et al. (2010) que trabalharam com KNO_3 e NH_4Cl como fontes de nitrogênio em associação. Estes autores sugeriram que o KNO_3 foi uma fonte de nitrogênio importante no começo dos experimentos, atuando como fonte de reserva, quando menores quantidades de NH_4Cl foram adicionadas.

Os valores determinados para a concentração de amônia, especialmente para os cultivos de confirmação da otimização ($CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$), ficaram abaixo do limite de detecção da metodologia analítica (dados não apresentados), o que pode ocorrer em cultivos com intensidades luminosas não limitantes (BEZERRA et al., 2008). Desse modo, ficou assegurado que as concentrações de amônia se apresentaram

abaixo dos níveis considerados como inibitórios (10,0 mmol L^{-1}, BELKIN; BOUSSIBA, 1991; 6,0 mmol L^{-1}, CARVALHO et al., 2004).

Devido à relação existente entre X_m e P_X dada na Equação 5 e pela utilização do mesmo tempo de cultivo (T_c) em todos os experimentos, os valores de produtividade celular refletem a mesma relação do que os valores de concentração celular máxima já avaliados. Assim, no cultivo $CAPF_{12}$ (Tabela 01, parte A), obteve-se o maior valor de produtividade celular (708 mg L^{-1} d^{-1}) e no cultivo $CAPF_{13}$ (Tabela 01, parte A) foi registrado o menor valor de produtividade celular (468 mg L^{-1} d^{-1}).

6.1.3 Composição da biomassa

6.1.3.1 *Conteúdo de clorofila-a*

Sabe-se que o nitrogênio é o elemento fundamental da molécula de clorofila, portanto o conteúdo de clorofila-a na biomassa de *A. platensis* depende diretamente da composição do meio e particularmente do tipo e quantidade da fonte de nitrogênio. Embora o meio reaproveitado tenha sido utilizado após a reposição de mesma quantidade de $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio, os valores de clorofila-a atingidos no final do crescimento apresentaram diferentes valores (Tabela 01). O valor médio de conteúdo de clorofila-a na biomassa dos experimentos de confirmação da otimização ($CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$) (24,3 ± 0,1 mg Chl-a g $células^{-1}$) foi maior em 54 e 44 % do que o valor dos testes em meio padrão ($CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$) (15,8 ± 0,3 mg Chl-a g células $^{-1}$) e meio reaproveitado sem tratamento ($CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$) (16,9 ± 1,6 mg Chl-a g^{-1} células), respectivamente.

Apesar de terem sido utilizadas as mesmas quantidades iniciais de $NaNO_3$ em todos os experimentos, outros fatores como a concentração celular e a correspondente intensidade luminosa disponível para as células poderiam ter tido influência na produção de clorofila (RANGEL-YAGUI et al., 2004). Devido às elevadas concentrações celulares dos experimentos após os tratamentos, o efeito de sombreamento (MATSUDO et al., 2009) poderia ter acontecido devido ao maior crescimento celular. Confirma-se assim, o relatado por Rodrigues et al. (2010) que verificaram que *A. platensis* incrementa a sua produção de clorofila melhorando a

eficiência da captação fotossintética para compensar a pouca intensidade luminosa recebida pelas células.

A Tabela 02 mostra que os valores de conteúdo de clorofila na biomassa, em condições ótimas de remoção de MO, foram maiores do que os valores relatados anteriormente no cultivo de *A. platensis* em FBR abertos (minitanques) e FBR fechados utilizando meios de cultivo de similar composição.

Tabela 02 – Teor de clorofila em cultivos de *A. platensis* utilizando diferentes FBR.

Referência	FBR	Meio de Cultivo	Fonte de nitrogênio	Intensidade luminosa (µmol m^{-2} s^{-1})	Concentração celular máxima (g L^{-1})	Clorofila-a na biomassa *Chl* (mg g^{-1})
Vieira et al. (2012)	Aberto	Paoletti (1975)[a]	Ureia + $NaNO_3$	156,0	4,431 – 6,179	12,4 – 25,1
Ajayan e Selvaraju (2011)	Fechado	Kaushik (1987)[a]	KNO_3 ou ureia	30,0 – 72,0	1,08 – 1,42	10,2 – 14,0
Chen et al. (2010)	Fechado	Zarrouk (1966)[a]	$NaNO_3$	1500,0	0,04 – 0,366	11,66 – 20,95
Rodrigues et al. (2010)	Aberto	Paoletti (1975)[a]	KNO_3 + NH_4Cl	156,0	2,013 – 4,551	8,81 – 22,69
Ranguel Yagui et al. (2004)	Aberto	Paoletti (1975)[a]	KNO_3	16,8 – 67,2	0,408 – 1,945	6,0–19,9
Danesi et al. (2004)	Aberto	Paoletti (1975)[a]	KNO_3	24,0 – 60,0	0,687 – 1,799	6,2 – 15,3
Danesi et al. (2002)	Aberto	Paoletti (1975)[a]	Ureia	30,0	0,942 – 1,591	10,2 – 12,3
Tratamento com *CAP* e *F*, Item 6.1	Fechado	Schlösser (1982)[b]	$NaNO_3$	120,0	2,029 – 4,931	15,0 – 32,0
Tratamento com *CAP* e *S*, Item 6.2	Fechado	Schlösser (1982)[b]	$NaNO_3$	120,0	1,702 – 4,917	10,5 – 30,2
Tratamento com *CAG* e *F*, Item 6.3	Fechado	Schlösser (1982)[b]	$NaNO_3$	120,0	1,943 – 3,281	9,0 – 35,0

[a]Meio padrão sem reuso
[b]Meio reusado após diferentes tratamentos

6.1.3.2 *Conteúdo de lipídeos e proteínas*

O teor de lipídeos em biomassas de cianobactérias pode sofrer influência de temperatura, intensidade luminosa, concentração celular e fonte de nitrogênio.

Spirulina sp. contém 6 – 13 % de lipídeos, sendo que metade são ácidos graxos (COHEN, 1997). Tanticharoen et al. (1994) observaram que os lipídeos e ácidos graxos de *Spirulina sp.* dependem da cepa e das condições do meio ambiente.

O teor de lipídeos obtido nos pontos de ótimo foi 7,7 ± 0,1 %, sendo da mesma ordem de grandeza que os obtidos por Rafiqul, Jalal e Alam (2005) (7,2 %) em cultivo de *A. platensis* em FBR fechado sob diferentes condições ambientais como luz, temperatura e pH. Porém, os conteúdos totais de lipídeos obtidos nesta parte do trabalho são menores do que os valores (19,2 – 20,9 %) reportados por Rodrigues et al. (2010) que usaram nitrato de potássio e cloreto de amônio simultaneamente em FBR abertos, evidenciando a influência da associação dessas fontes de nitrogênio na produção de lipídeos.

É bem conhecido que o conteúdo de proteínas de muitas cianobactérias é afetado pelos diversos fatores nutricionais e ambientais presentes no cultivo (OLGUÍN et al., 2001). De fato, Sassano (2004) observou que os teores de proteínas nas biomassas decaíram significativamente, a valores que chegaram a 16,5 %, em cultivos realizados sob limitação de nitrogênio.

Particularmente, no cultivo $CAPF_{13}$ obteve-se o menor valor de teor de proteínas (25,1 %, Tabela 01). Por outro lado, o maior valor de teor de proteína de 36,2 % (Tabela 01) foi no cultivo $CAPF_{12}$. O valor de proteína dos cultivos de confirmação da otimização ($CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$) foi 36,1 ± 0,6 %, correspondendo aos maiores valores do que os atingidos nos experimentos em meio padrão ($CAPF_{23}$-$CAPF_{25}$) (25,8 ± 0,9 %) bem como em meio Schlösser reaproveitado sem tratamento ($CAPF_{26}$-$CAPF_{28}$) (24,6 ± 0,5 %). Adicionalmente, esses valores são da mesma ordem de grandeza dos maiores valores (38 %) reportados por Ferreira et al. (2010) que trabalharam com FBR tubulares usando processo de batelada alimentada e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, bem como dos valores (27,3 – 43,7 %) reportados por Bezerra et al. (2008) que trabalharam com FBR aberto e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Isso indica que nesses ensaios houve disponibilidade de nitrogênio suficiente tanto para o crescimento celular quanto para a produção de nitrogênio orgânico, na forma de proteínas, como material de reserva da célula.

Contudo, os valores de proteína atingidos nesta parte do trabalho são menores do que os valores (49,3 – 51,5 %) reportados por Rodrigues et al. (2010) que avaliaram o uso simultâneo de nitrato de potássio e cloreto de amônio como

fonte de nitrogênio em FBR abertos, provavelmente pela menor velocidade média de crescimento associada ao cultivo em FBR aberto, cujo valor médio foi da ordem de 3 vezes menor do que a obtida nesta parte do trabalho.

6.1.4 Análise Estatística

Utilizando os resultados obtidos, foram calculados os parâmetros para cada cultivo, $CAPF_1$ a $CAPF_{22}$: RA_{254} (Remoção A_{254}), RA_{440} (Remoção A_{440}), X_m (concentração celular máxima), *Chl* (conteúdo de clorofila-a na biomassa), *PTN* (conteúdo total de proteína na biomassa seca) e P_X (produtividade celular) (Tabela 01).

Esses parâmetros foram avaliados por análise de regressão multivariável para estudar a influência das variáveis independentes em estudo (quantidades de carvão ativado em pó, cloreto férrico e tempo de contato), nas respostas de interesse (variáveis dependentes), sendo as regressões realizadas com os valores codificados das variáveis independentes, como comentado em Materiais e Métodos, e apresentados na Tabela 03.

Na metodologia de superfície de resposta (MSR) para cada variável dependente foi feita uma análise de regressão quadrática multivariável, onde foram consideradas as duas variáveis independentes codificadas (X_1 e X_2), bem como suas formas quadráticas e, suas interações, e, ainda, foi obtida uma equação referente a um modelo de superfície de resposta que mais se adequou aos resultados obtidos.

Junto às análises que foram realizadas, encontram-se os chamados níveis descritivos (*P*), que indicam os erros. Na análise de regressão, os valores de *P* indicam o menor erro em que se incorre ao afirmar que um determinado coeficiente associado a um determinado fator tem influência na determinação do parâmetro estimado. Em outras palavras, testando o coeficiente correspondente a uma variável independente é possível verificar se esta tem importância na determinação do parâmetro estimado. Na análise de variância da regressão, por sua vez, o valor de *P* indica se houve um bom ajuste da equação obtida através da regressão, ou seja, se a regressão realizada foi satisfatória (RODRIGUES, 1998).

Tabela 03 – Coeficientes de correlação estimados pela Equação 08 na predição dos parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl*, *PTN* e P_X.

Parâmetro	RA_{254}	RA_{440}	X_m	*Chl*	*PTN*	P_X
y_i	i=1	i=2	i=3	i=4	i=5	i=6
a_i	91,05	95,1	4740	25,33	32,55	670,1
b_{ij}						
j=1	0,146	0,096	-6,24	-0,325	-0,164	-0,853
j=2	0,908	0,835	59,97	2,194	0,737	8,5290
j=3	4,432	4,505	403,6	2,697	2.405	57,77
c_{ij}						
j=1	-0,665	-0,553	-51,47	-1,027	-0,774	-7,381
j=2	-0,489	-0,553	-30,74	-0,149	0,349	-4,57
j=3	-3,300	-3,364	-291,1	-2,292	-1,319	-41,64
$d_{ijj'}$						
jj'=1,2	-0,75	-0,625	-59,63	-0,663	-0,738	-8,375
jj'=1,3	0,25	0,125	-23,38	0,0875	-0,063	-3,375
jj'=2,3	1,00	1,125	162,1	1,913	0,788	23,13
F_{calc}	30,39	23,13	16,81	7,278	8,59	16,75
R^2 ajustado	0,94	0,92	0,89	0,76	0,79	0,89
Valor *P*	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,003	0,0008	0,001

Tendo em vista que o objetivo foi a otimização do crescimento do micro-organismo no meio reaproveitado, X_m foi utilizado como parâmetro de controle que permitiu a otimização das condições apropriadas de tratamento de meio proveniente de cultivo prévio usando processo descontínuo alimentado.

A equação obtida na análise de regressão para concentração celular máxima (X_m) foi:

$$X_m = 4740 - 6{,}24\ X_1 + 59{,}97\ X_2 + 403{,}6\ X_3 - 51{,}47\ X_1^2 - 30{,}74\ X_2^2 - 291{,}1\ X_3^2 - 59{,}63\ X_1X_2 - 23{,}38\ X_1X_3 + 162{,}1\ X_2X_3 \qquad \text{(Equação 09)}$$

Após a derivação da Equação 09, chegou-se aos valores codificados X_1 = -1,556, X_2 = 2,582 e X_3 = 0,037 como os correspondentes pontos de ótimo. Esses valores representam, 24,44 mg L^{-1} de carvão ativado em pó, 20,33 mg L^{-1} de cloreto férrico e 30,37 min de tempo de contato, respectivamente, com uma concentração celular máxima esperada de 4846 mg L^{-1}. Assim, os cultivos de ótimo ($CAPF_{20}$-$CAPF_{22}$), foram realizados para confirmação do modelo, com estas condições pré-determinadas.

O valor médio da concentração celular máxima (X_m = 4893 ± 33 mg L^{-1}) dos experimentos de confirmação da otimização é 1 % maior do que o valor estimado a partir da Equação 09 (4846 mg L^{-1}), confirmando a utilidade da regressão multivariável na otimização das condições experimentais para maximização de X_m.

No Gráfico 03 apresentam-se os gráficos de superfície de resposta considerando os valores de tempo de contato no nível central do planejamento (*T* = 30,0 min) onde atingiu-se um modelo apropriado de regressão multivariável. Esse valor foi considerado devido a sua proximidade com o valor do ponto de otimização (*T* = 30,4 min). Este gráfico mostra claramente a influência dos valores de *CAP* e *F* nas respostas avaliadas. De modo geral, como se observa pelos próprios valores negativos dos coeficientes quadráticos dos modelos matemáticos (c_{ij}, Tabela 03), houve um incremento das respostas até um determinado valor das variáveis *CAP* e *F*, a partir do qual houve uma diminuição da variável resposta.

Particularmente, o painel C do Gráfico 03 demonstra a validade da otimização de X_m que foi possível graças à apropriada remoção de MO dos meios tratados para reaproveitamento. O painel F do Gráfico 03 mostra que *Chl* tem o mesmo comportamento que X_m em função de X_1 e X_2. Provavelmente o aumento da concentração celular levou a um maior sombreamento das células, provocando a necessidade de maior formação de pigmentos para aumentar a eficiência na captação de luz.

O Gráfico 04 mostra que o incremento nos valores de RA_{254} e RA_{440} contribuiu para o maior crescimento celular. Mostra também que a remoção de MO foi mais efetiva no crescimento celular que a remoção de pigmentos.

A regressão multivariável do parâmetro *LIP* foi realizada, mas os resultados não foram influenciados pelas condições experimentais e, portanto, não é apresentada neste trabalho.

Tendo em vista que o número de variáveis foi elevado, a MSR permitiu a exploração dos resultados experimentais, avaliando simultaneamente as variáveis independentes e conseguindo explicar as suas interações.

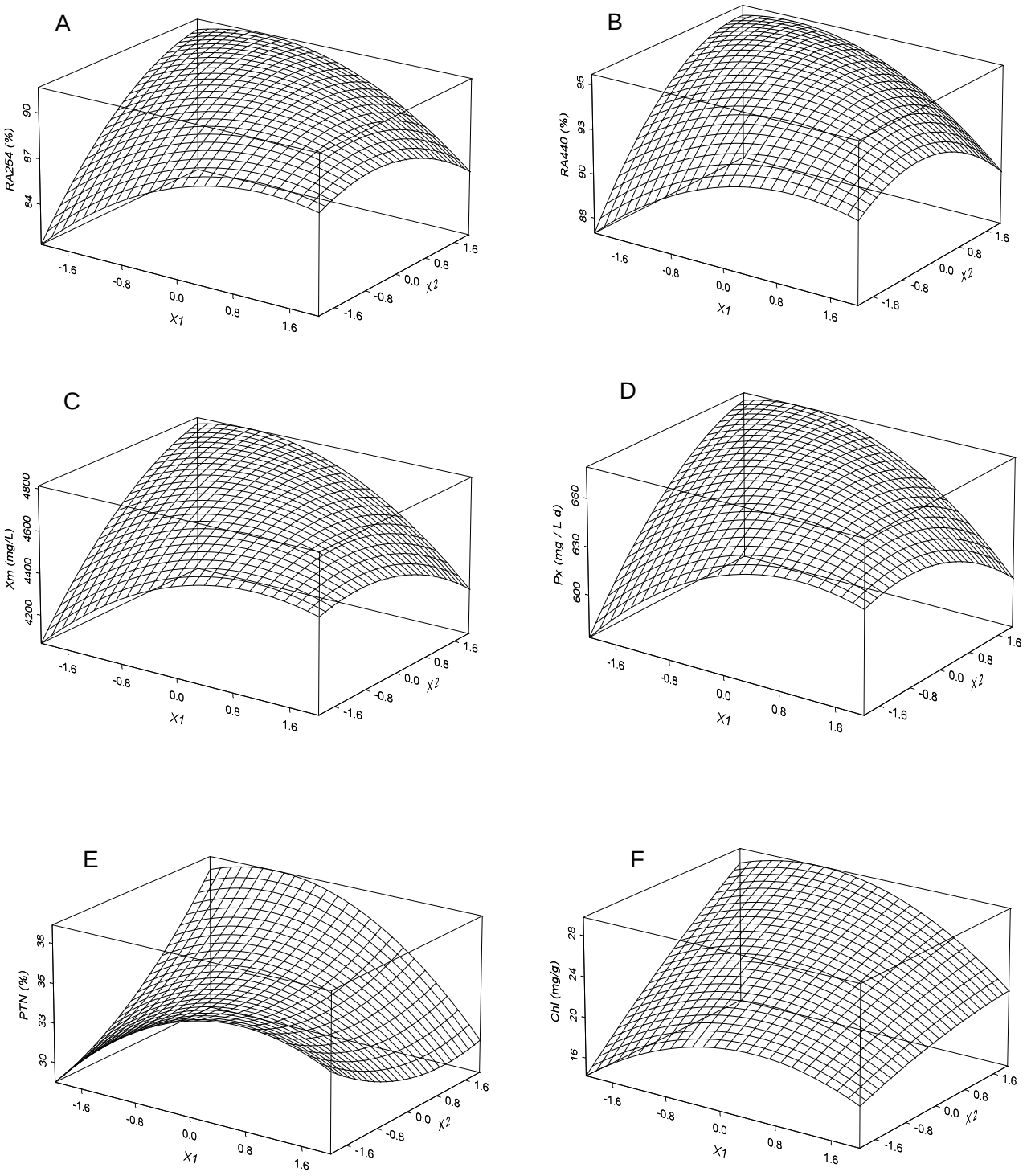

Gráfico 03 – Superfície de resposta de A. RA_{254}, B. RA_{440}, C. X_m, D. P_X, E. *PTN*, e F. *Chl* em função dos valores codificados de quantidades de carvão ativado em pó (X_1) e cloreto férrico (X_2) considerando o tempo de contato (X_3) no nível central do planejamento (T = 30,0 min).

Todos os parâmetros (RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl, PTN* e P_X) foram avaliados também realizando uma comparação entre os valores reais e os calculados utilizando os modelos matemáticos (Tabela 04), sendo as diferenças médias entre eles, inferiores a 5 %. Assim, é evidente que os valores obtidos para todos esses parâmetros podem ser descritos pelos modelos matemáticos deste trabalho e permitem demonstrar a validade do processo de remoção de MO e pigmentos no cultivo de *A. platensis* em meio reaproveitado.

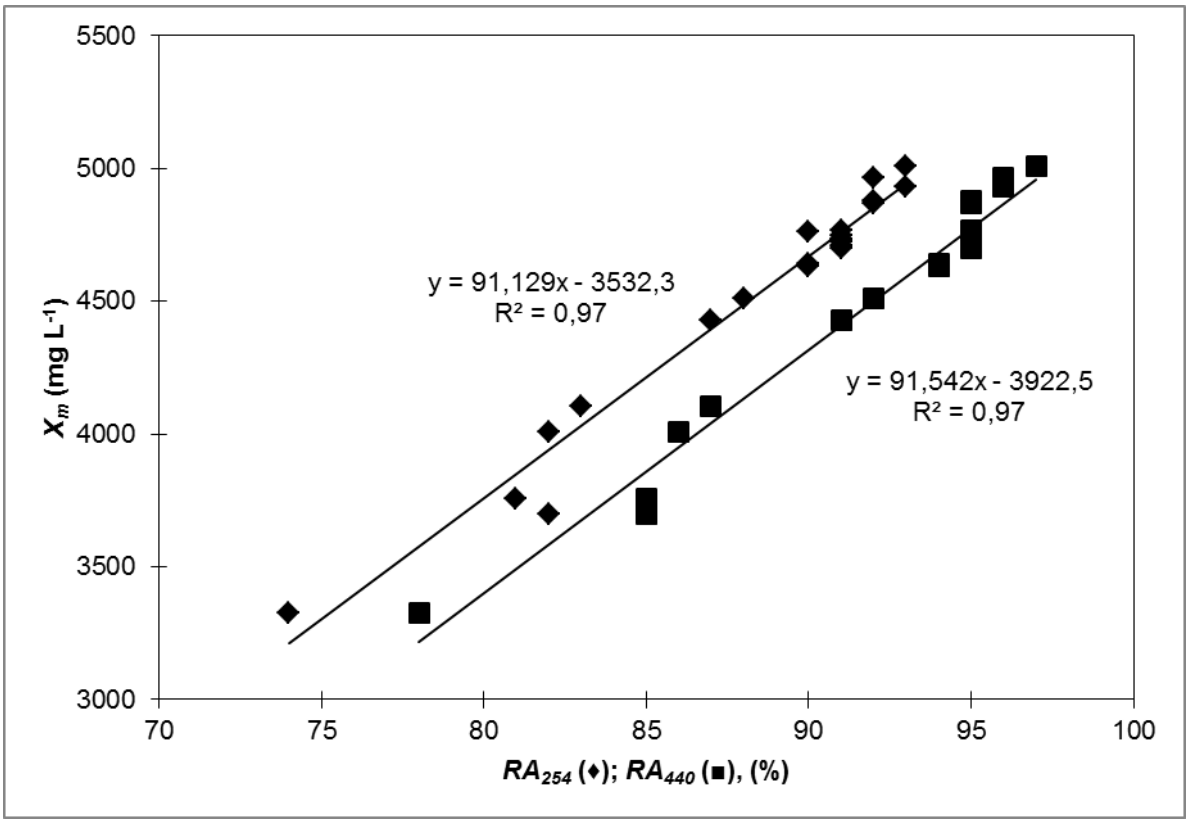

Gráfico 04 – Concentração celular máxima (X_m) em função de Remoção de A_{254} (RA_{254}, ♦) e Remoção de A_{440} (RA_{440}, ■).

Tabela 04 – Comparação dos valores experimentais das variáveis dependentes (RA_{254}, X_m, *Chl*, *PTN* e P_X) e seus correspondentes valores estimados por regressão multivariável.

Experimento	X_1	X_2	X_3	RA_{254} (%)	RA_{254} *est* (%)	X_m (mg L^{-1})	X_m *est* (mg L^{-1})	*Chl* (mg g^{-1})	*Chl est* (mg g^{-1})	*PTN* (%)	*PTN* est (%)	P_X (mg L^{-1} d^{-1})	P_X *est* (mg L^{-1} d^{-1})
Parte A: Planejamento experimental inicial													
$CAPF_1$	-1	-1	-1	82	82	4008	3988	18	19	27,6	27,8	565	562
$CAPF_2$	1	-1	-1	83	83	4105	4141	19	19	28,5	29,1	579	584
$CAPF_3$	-1	1	-1	82	83	3700	3902	18	21	27,1	29,2	521	550
$CAPF_4$	1	1	-1	81	81	3755	3817	17	18	27,1	27,5	529	538
$CAPF_5$	-1	-1	1	87	88	4430	4519	19	20	29,9	31,2	626	639
$CAPF_6$	1	-1	1	90	90	4630	4579	22	21	32,6	32,2	654	647
$CAPF_7$	-1	1	1	92	93	4967	5083	28	30	34,6	35,7	702	719
$CAPF_8$	1	1	1	91	93	4732	4904	27	28	32,3	33,7	669	693
$CAPF_9$	-1,687	0	0	90	89	4760	4604	26	23	31,8	30,6	673	651
$CAPF_{10}$	1,687	0	0	90	89	4640	4583	22	22	29,7	30,1	656	648
$CAPF_{11}$	0	-1,687	0	88	88	4510	4551	21	21	31,7	32,3	637	643
$CAPF_{12}$	0	1,687	0	93	91	5008	4754	32	29	36,2	34,8	708	672
$CAPF_{13}$	0	0	-1,687	74	74	3326	3229	16	14	25,1	24,7	468	454
$CAPF_{14}$	0	0	1,687	91	89	4710	4594	24	23	33,3	32,9	666	649
$CAPF_{15}$	0	0	0	91	91	4731	4740	26	25	31,7	32,6	669	670
$CAPF_{16}$	0	0	0	91	91	4750	4740	25	25	33,1	32,6	671	670
$CAPF_{17}$	0	0	0	91	91	4723	4740	25	25	31,2	32,6	668	670
$CAPF_{18}$	0	0	0	91	91	4698	4740	26	25	32,3	32,6	664	670
$CAPF_{19}$	0	0	0	91	91	4765	4740	26	25	32,6	32,6	674	670
Parte B: Confirmação da Otimização													
$CAPF_{20}$	-1,56	2,58	0,04	93	92	4931	4846	24	31	35,7	38,3	697	683
$CAPF_{21}$	-1,56	2,58	0,04	92	92	4879	4846	24	31	36,8	38,3	690	683
$CAPF_{22}$	-1,56	2,58	0,04	92	92	4870	4846	24	31	35,8	38,3	689	683

6.2 *Otimizacão das condições de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado com uso de sulfato férrico e carvão ativado em pó*

6.2.1 Remoção de matéria orgânica e pigmentos

A Tabela 05 mostra que os valores de RA_{254} e RA_{440} variam entre 22 – 69 % e 33 – 61 %, respectivamente. Além disso, observa-se que quando os valores de *CAP* e *T* são mantidos ao mesmo nível, o incremento nos valores de *S* pode produzir uma diminuição nos valores de RA_{254} e RA_{440}. Para valores baixos de *CAP*, o incremento nos valores de *S* pode ser compensado com o incremento de *T* para manter valores apropriados de RA_{254} e RA_{440}. Porém, nos tratamentos com valores elevados de *CAP*, nem os valores elevados de *S* nem os valores elevados de *T* são suficientes para manter os valores de RA_{254} e RA_{440}. Fica evidente que os incrementos nos valores de *CAP* não são vantajosos neste tipo de processo simultâneo, sendo que os maiores valores de RA_{254} corresponderam ao ponto central do planejamento experimental ($CAPS_{15}$-$CAPS_{19}$). Os experimentos de confirmação da otimização tem os valores mais altos de RA_{254} e RA_{440} (68,3 ± 0,6 % e 60,7 ± 0,6 %, respectivamente) e precisam valores de *S* e *T* maiores do que os correspondentes pontos centrais do planejamento experimental.

Os valores da Tabela 05 permitem sugerir que o tempo de contato (*T*) é um parâmetro fundamental numa remoção mais eficiente de MO e pigmentos. Os valores de RA_{254} e RA_{440} nos experimentos de confirmação da otimização são maiores que os valores obtidos por Song, Williams e Edyvean (2004) que avaliaram a influência do pH, quantidade de sulfato férrico e sulfato de alumínio no processo de coagulação utilizado para remover contaminantes em efluentes de curtume e atingiram valores de remoção de sólidos suspensos de 38 – 46 %.

A natureza hidrofílica da MO apresenta maior dificuldade para ser removida utilizando processo de coagulação (Amy et al., 1992). Assim, a coagulação, geralmente, é mais efetiva para remover MO de natureza hidrofóbica. Apesar de não existirem estudos que definam a natureza da MO presente no meio de cultivo exaurido, é possível sugerir que a matéria orgânica pode ser, principalmente, de natureza hidrofóbica, devido aos valores elevados de RA_{254} e RA_{440}.

Muitos estudos de avaliação de coagulação e adsorção para a remoção de MO têm sido realizados, atingindo percentagens de remoção de 45 – 80 % (NAJM; TATE; SELBY, 1998; ALVAREZ-URIARTE et al., 2010; UYAK et al., 2007). Além disso, a remoção de MO por esses processos é mais efetiva para moléculas de elevada massa molar, como o ácido húmico. Particularmente, *CAP* remove MO de média ou baixa massa molar, incluindo moléculas de baixo valor de UVA específico a 254 nm ($SUVA_{254}$) (NILSON; DIGIANO, 1996; OWEN et al., 1995).

6.2.2 Crescimento celular em meios tratados

Os experimentos de confirmação de otimização (Tabela 05, parte B) apresentam os valores maiores de remoção e levaram aos maiores valores de concentração celular máxima (X_m = 4863 ± 64 mg L^{-1}). A Tabela 05 mostra que valores elevados de *CAP* e *S* tem relação direta com os valores de X_m. Valores elevados de RA_{254} e RA_{440} levam a valores elevados de X_m devido, provavelmente, ao incremento na disponibilidade de luz para o crescimento de *A. platensis*.

Como foi mencionado anteriormente, os experimentos da parte C da Tabela 05 foram realizados com o intuito de comparar esses valores com os valores dos tratamentos do planejamento experimental. O Gráfico 05 e a Tabela 05 mostram que os valores de X_m dos experimentos de confirmação da otimização ($CAPS_{20}$-$CAPS_{22}$) são 125 % maiores do que os valores dos experimentos utilizando meio padrão ($CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$) e 72 % maiores do que os experimentos realizados com meio exaurido sem tratamento ($CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$).

O incremento de pH no meio durante o cultivo de *A. platensis* é devido ao consumo da fonte de carbono e nitrogênio do meio. Seu cultivo em meio tratado, teve o valor de pH fixado entre valores de 9,5 ± 0,2, com adição de CO_2 de cilindro, para evitar limitação de crescimento pela limitação de carbono. O consumo de nitrogênio foi demostrado nos experimentos de reuso pelos valores baixos de concentração final de nitrato (0,03 – 0,09 g L^{-1}).

Como a mesma quantidade de $NaNO_3$ foi adicionada ao começo dos experimentos de reuso, as variações nos valores de X_m podem ser atribuídas às condições experimentais aplicadas no planejamento experimental (variações de *CAP*, *S* e *T*).

Tabela 05 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados com carvão ativado em pó e sulfato férrico segundo planejamento experimental.

Experimento	Valores codificados			Valores reais			RA_{254}[d]	RA_{440}[e]	X_m[f]	Chl-a[g]	PTN[h]	LIP[i]	P_X[j]	Chl[k]	P_{Chl}[l]
	X_1[a]	X_2[b]	X_3[c]	CAP (mg L^{-1})	S (mg L^{-1})	T (min)	(%)	(%)	(mg L^{-1})	(mg L^{-1})	(%)	(%)	(mg L^{-1} d^{-1})	(mg g^{-1})	(mg L^{-1} d^{-1})
Parte A: Planejamento experimental inicial															
$CAPS_1$	-1	-1	-1	30,0	15,0	20,0	49	49	1906	24,5	49,8	7,7	265	12,9	3,4
$CAPS_2$	1	-1	-1	50,0	15,0	20,0	45	42	1990	27,4	50,4	8,4	277	13,8	3,8
$CAPS_3$	-1	1	-1	30,0	35,0	20,0	40	44	1711	21,4	49,1	7,3	237	12,5	3,0
$CAPS_4$	1	1	-1	50,0	35,0	20,0	38	39	1775	22,4	47,9	7,8	246	12,6	3,1
$CAPS_5$	-1	-1	1	30,0	15,0	40,0	38	39	1720	25,4	46,0	8,1	239	14,8	3,5
$CAPS_6$	1	-1	1	50,0	15,0	40,0	43	46	1702	24,7	52,8	7,3	236	14,5	3,4
$CAPS_7$	-1	1	1	30,0	35,0	40,0	52	34	2800	32,4	53,9	7,1	393	11,6	4,5
$CAPS_8$	1	1	1	50,0	35,0	40,0	35	39	3989	57,3	54,6	7,4	563	14,4	8,1
$CAPS_9$	-1,687	0	0	23,1	25,0	30,0	64	60	1767	17,1	55,9	8,4	245	9,7	2,4
$CAPS_{10}$	1,687	0	0	56,9	25,0	30,0	63	61	2024	21,2	54,1	8,3	282	10,5	3,0
$CAPS_{11}$	0	-1,687	0	40,0	8,1	30,0	52	61	2929	35,9	53,7	7,4	411	12,3	5,0
$CAPS_{12}$	0	1,687	0	40,0	41,9	30,0	27	36	4363	105,7	52,2	8,4	616	24,2	14,9
$CAPS_{13}$	0	0	-1,687	40,0	25,0	13,1	22	37	2881	64,2	46,4	7,2	404	22,3	9,0
$CAPS_{14}$	0	0	1,687	40,0	25,0	46,9	28	33	3764	86,8	50,5	8,1	531	23,0	12,2
$CAPS_{15}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0	68	56	4534	121,0	58,9	8,0	641	26,7	17,1
$CAPS_{16}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0	65	57	4429	118,0	56,8	8,4	626	26,6	16,7
$CAPS_{17}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0	68	58	4521	129,7	55,9	8,3	639	28,7	18,3
$CAPS_{18}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0	63	59	4410	118,7	58,0	7,9	623	26,9	16,8
$CAPS_{19}$	0	0	0	40,0	25,0	30,0	64	59	4590	138,4	57,7	8,4	649	30,2	19,6

Continuacão Tabela 05

Parte B: Confirmação da Otimização															
$CAPS_{20}$	0	0,775	0,614	40,0	32,8	36,1	68	60	4792	120,4	59,5	7,2	677	25,2	17,0
$CAPS_{21}$	0	0,775	0,614	40,0	32,8	36,1	69	61	4879	117,9	60,7	7,1	690	24,2	16,7
$CAPS_{22}$	0	0,775	0,614	40,0	32,8	36,1	68	61	4917	118,7	59,7	7,4	695	24,1	16,8
Parte C: Experimentos adicionais															
$CAPS_{23}^{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2210	40,1	28,1	6,5	309	18,1	5,6
$CAPS_{24}^{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2158	41,2	27,9	7,1	301	19,1	5,7
$CAPS_{25}^{m}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2108	42,1	26,9	7,4	294	20,0	5,9
$CAPS_{26}^{n}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2895	31,2	30,3	8,1	406	10,8	4,4
$CAPS_{27}^{n}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2811	32,3	29,3	8,3	394	11,5	4,5
$CAPS_{28}^{n}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2764	30,7	29,2	8,7	388	11,1	4,3

[a] Valores codificados de quantidade de carvão ativado em pó (*CAP*)
[b] Valores codificados de quantidade de sulfato férrico (*S*)
[c] Valores codificados de tempo de contato (*T*)
[d] Remoção de absorbância em comprimento de onda 254 nm
[e] Remoção de absorbância em comprimento de onda 440 nm
[f] Concentração máxima de biomassa
[g] Concentração de clorofila-a na suspensão celular
[h] Conteúdo total de proteínas na biomassa seca
[i] Conteúdo total de lipídeos na biomassa seca
[j] Produtividade celular
[k] Conteúdo de clorofila-a na biomassa seca
[l] Produtividade de clorofila-a
[m] Teste em meio padrão (SCHLÖSSER, 1982) com 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$
[n] Teste em meio exaurido após cultivo em batelada, sem tratamento prévio, com reposição de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$

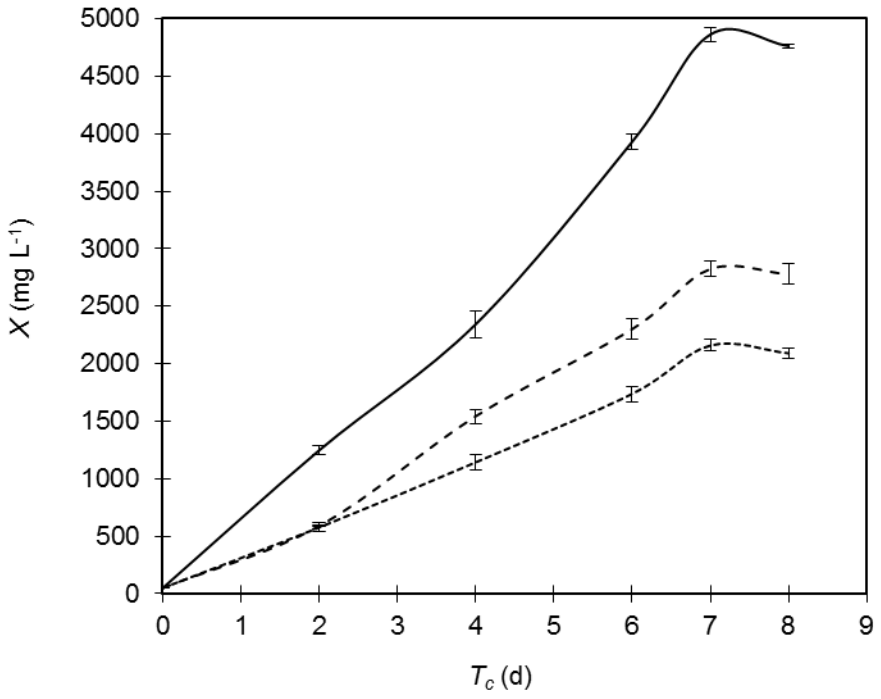

Gráfico 05 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados. $CAPS_{20}$-$CAPS_{22}$: Confirmação da Otimização (*CAP* = 40,0 mg L^{-1}, *S* = 32,8 mg L^{-1}, *T* = 36,1 min) (—), $CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$: Meio padrão (·····), $CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$: Meio exaurido sem tratamento (---), barras de erro correspondem ao desvio padrão.

A relação entre X_m e P_X da Equação 05 permite realizar a mesma análise para ambos os parâmetros, uma vez que foi utilizado o mesmo tempo de cultivo em todos os experimentos (Gráfico 05).

6.2.3 Composição da biomassa

6.2.3.1 *Conteúdo de clorofila-a*

A Tabela 05 mostra que a pesar de ter sido adicionada sempre a mesma quantidade de $NaNO_3$ nos meios tratados, os valores de clorofila-a variaram segundo cada tipo de tratamento. Os experimentos correspondentes ao ponto central do planejamento experimental ($CAPS_{15}$-$CAPS_{19}$) atingiram os maiores valores de conteúdo de clorofila-a e produtividade de clorofila-a (27,8 ± 1,6 mg Chl-a g^{-1} células e 17,7 ± 0,02 mg L^{-1} d^{-1}, respectivamente). O valor médio de conteúdo de

clorofila-a (24,5 ± 0,6 mg Chl-a g^{-1} células) dos experimentos de confirmação da otimização ($CAPS_{15}$-$CAPS_{19}$) foi 28 % maior do que o conteúdo (19,1 ± 0,9 mg Chl-a g^{-1} células) nos experimentos com meio padrão ($CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$) e 118 % maior do que o conteúdo (11,1 ± 0,4 mg Chl-a g^{-1} células) nos experimentos com meio exaurido sem tratamento ($CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$).

De modo geral, o incremento nos valores de *CAP* e/ou *T* pode produzir um incremento nos valores de *Chl* (Tabela 05). Porém, o incremento nos valores de *S* pode provocar uma diminuição nos valores de *Chl*. Como é esperado, devido à relação entre *Chl* e P_{Chl} mostrada na Equação 07, é possível realizar a mesma avaliação para ambos os parâmetros.

A Tabela 02 mostra que os valores de conteúdo de clorofila-a atingidos em condições ótimas de tratamento foram maiores do que os obtidos em outras publicações no cultivo de *A. platensis* com meios de similar composição, porém utilizando FBR abertos e fechados. De fato, um efeito de sombreamento devido à elevada concentração de biomassa no final dos experimentos deste trabalho pode ter produzido o incremento na produção de clorofila para melhorar a eficiência na captura de fótons e assim, compensar a baixa quantidade de luz recebida pelas células (RODRIGUES et al., 2010).

6.2.3.2 *Conteúdo de lipídeos e proteínas*

Os valores de teores de lipídeos obtidos nesta parte do trabalho, praticamente não apresentaram variação (Tabela 05). Da mesma forma, não houve diferença com os valores de lipídeos dos experimentos em meio padrão ($CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$) e exaurido sem tratamento ($CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$). Esses resultados estão justificados pelo fato da *A. platensis* somente alterar a condição de produção de lipídeos em extrema deficiência de nitrogênio no meio de cultivo (SASSANO et al., 2010). Como mencionado anteriormente, os resultados são da mesma ordem de grandeza que o valor obtido (7,2 %) por Rafiqul, Jalal e Alam (2005) em cultivo de *A. platensis* em FBR fechado sob diferentes condições ambientais como luz, temperatura e pH. Porém, os conteúdos totais de lipídeos obtidos nesta etapa são menores do que os valores (19,2 – 20,9 %) reportados por Rodrigues et al. (2010) que usaram nitrato de potássio e cloreto de amônio simultaneamente em FBR abertos.

A Tabela 05 mostra que os conteúdos de proteína (46,0 – 60,7 %) na biomassa cultivada em meios tratados variaram segundo cada condição experimental adotada.

Uma análise direta dos resultados da Tabela 05 não permite estabelecer uma relação direta das condições experimentais e os teores de proteína das correspondentes biomassas, sendo somente possível fazer esse tipo de estimativa com a regressão multivariável, apresentada no item a seguir. Os valores de *PTN* nos experimentos de confirmação da otimização ($CAPS_{20}$-$CAPS_{22}$) foram 117 % maiores do que os valores nos experimentos em meio padrão ($CAPS_{23}$-$CAPS_{25}$) e 102 % maiores do que os experimentos em meio exaurido sem tratamento ($CAPS_{26}$-$CAPS_{28}$).

Tendo em vista que tanto o meio tratado como o meio não tratado são adicionados de nitrato de sódio antes do início dos cultivos, fica evidente que o nitrogênio, elemento mais comumente relacionado com o teor de proteína da biomassa de *A. platensis* (SASSANO et al., 2010), não foi o determinante das diferenças encontradas. Dessa forma, o tratamento de meio pode ter removido certos componentes ou deixado algum resíduo, o que provavelmente favoreceu a biosíntese de proteínas. Nesse sentido, numa primeira tentativa de esclarecimento deste fato, Morocho-Jácome; Carvalho (2013a) verificaram o efeito do EDTA e do íon férrico no crescimento e composição de *A. platensis*. Como comentado anteriormente, neste trabalho foi demonstrado o efeito benéfico do EDTA e do sulfato férrico no meio padrão Schlösser (1982). Adicionalmente, Morocho-Jácome; Carvalho (2013b) testaram o efeito da presença de EDTA e cloreto férrico no mesmo meio padrão. Os resultados de ambos os trabalhos sugerem que o sal sulfato foi mais efetivo que o sal cloreto, porém são necessários estudos adicionais para inferir se o efeito é devido aos ânions propriamente ditos ou se também estão envolvidos outros fatores, como remoção de componentes do meio associados ou não à presença desses ânions.

Como mencionado anteriormente, os valores de *PTN* (46,0 – 60,7 %) desta parte do trabalho foram maiores que os apresentados por Ferreira et al. (2010), que produziram biomassa com conteúdo de proteína de 28 – 38 % em FBR tubular com processo descontínuo alimentado utilizando sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, bem como os valores (27,3 – 43,7 %) de Bezerra et al. (2008) que usaram FBR abertos com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio.

6.2.4. Análise Estatística

A Tabela 06 resume os resultados de análise de regressão multivariável referente aos experimentos $CAPS_1$-$CAPS_{19}$ (Tabela 05) bem como os resultados correspondentes à análise de variância de cada uma das variáveis dependentes em função dos valores codificados das variáveis independentes.

As três variáveis independentes tiveram significância estatística nos valores de RA_{254} e RA_{440}. O ajuste para a regressão de RA_{254} (R^2 ajustado = 0,90, $P < 0,001$) mostrou valores negativos dos coeficientes quadráticos c_{12} e c_{13} (Tabela 06). Os coeficientes lineares b_{11} e b_{13} (X_1 e X_3, respectivamente), o coeficiente quadrático c_{11} (X_1^2) e o coeficiente de interação (X_1X_3) foram desconsiderados por não terem significância estatística. Além disso, há uma interação negativa entre X_1 e X_2 e uma interação positiva entre X_2 e X_3. Por outro lado, o ajuste para a regressão de RA_{440} (R^2 ajustado = 0,85, $P < 0,001$) também mostrou valores negativos dos coeficientes quadráticos c_{22} e c_{23} (Tabela 06). O coeficiente linear b_{21} (X_1), o coeficiente quadrático c_{21} (X_1^2) e os coeficientes das interações (X_1X_2 e X_2X_3) foram desconsiderados por não terem significância estatística. Os Gráficos 06A e 06B ilustram as superfícies de resposta de RA_{254} e RA_{440}, respectivamente, em função de X_2 e X_3 mantendo X_1 no nível central (CAP = 40,0 mg L^{-1}). Nos valores intermediários de X_1, X_2 e X_3 foram atingidos os maiores valores de remoção (RA_{254} e RA_{440}), explicando assim os resultados apropriados de crescimento celular.

A regressão multivariável de X_m (R^2 ajustado = 0,87, $P < 0,001$) permitiu obter a equação a seguir, representada no Gráfico 06C considerando a quantidade de carvão ativado em pó (X_1) no nível central do planejamento experimental (CAP = 40,0 mg L^{-1}):

$$X_m = 4520 + 392,7\ X_2 + 315,4\ X_3 - 1055,8\ X_1^2 - 440,7\ X_2^2 - 554,3\ X_3^2 + 472,1\ X_2X_3$$

(Equação 10)

A derivação da Equação 10 permitiu obter os valores codificados X_1 = 0,0, X_2 = 0,775 e X_3 = 0,614 como pontos de ótimo. Esses valores representam, 40,0 mg L^{-1} de carvão ativado em pó, 32,8 mg L^{-1} de sulfato férrico e 36,1 min de tempo de contato, respectivamente, com uma concentração celular máxima esperada de 4769 mg L^{-1}. Assim, os cultivos de ótimo ($CAPS_{20}$-$CAPS_{22}$), foram realizados para confirmação do modelo com estas condições.

O valor médio da concentração celular máxima (X_m = 4863 ± 65 mg L^{-1}) dos experimentos de confirmação da otimização é 2 % maior do que o valor estimado a partir da Equação 10 (4769 mg L^{-1}), confirmando a utilidade da regressão multivariável na otimização das condições experimentais para maximização de X_m.

Tabela 06 – Coeficientes de correlação estimados pela Equação 08 na predição dos parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, P_X, *Chl*, P_{Chl} e *PTN*.

Parâmetro	RA_{254}	RA_{440}	X_m	P_X	*Chl*	P_{Chl}	*PTN*
y_i	i = 1	i = 2	i = 3	i = 4	i = 5	i = 6	i = 7
a_i	65,08	57,72	4520	638,9	28,1	17,9	57,50
b_{ij}							
j=1	0	0	0	0	0	0	0
j=2	-3,81	-4,541	392,7	56,08	1,186	1,597	0
j=3	0	-1,661	315,4	45,30	0	0	1,243
c_{ij}							
j=1	0	0	-1055,8	-150,9	-6,900	-6,007	-1,135
j=2	-8,878	-4,480	-440,7	-63,12	-4,089	-3,372	-1,855
j=3	-13,96	-9,223	-554,3	-79,29	-2,508	-3,196	-3,436
$d_{ijj'}$							
jj'=1,2	-2,50	0	0	0	0	0	-0,988
jj'=1,3	0	3,00	0	0	0	0	1,013
jj'=2,3	2,75	0	472,1	67,5	0	0	1,613
F_{calc}	33,53	21,64	20,87	20,94	30,27	30,81	14,54
R^2 ajustado	0,90	0,85	0,87	0,87	0,87	0,87	0,84
Valor P	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

A regressão obtida para P_x (R^2 = 0,87, P < 0,001) (Gráfico 06D, Tabela 06) tem a mesma análise que para X_m devido à relação descrita pela Equação 05.

A relação entre *Chl* e P_{Chl} apresentadas nas Equações 06 e 07 permite explicar o comportamento similar para ambos os parâmetros. Os Gráficos 06E e 06F ilustram as superfícies de resposta de *Chl* e P_{Chl} em função de X_2 e X_3 mantendo X_1 no nível central (*CAP* = 40,0 mg L^{-1}), demonstrando que valores elevados de *Chl* e P_{Chl} acontecem em níveis intermédios das variáveis independentes avaliadas.

O Gráfico 06G apresenta a superfície de resposta de *PTN* em função de X_2 e X_3 mantendo X_1 no nível central (*CAP* = 40,0 mg L^{-1}). De modo geral, o perfil do Gráfico 06G correspondente à superfície de resposta de *PTN* frente aos níveis das variáveis independentes se assemelha ao perfil do Gráfico 06C que representa a superfície de resposta para X_m.

A regressão multivariável também foi aplicada aos dados experimentais de *LIP*, porém não foi evidenciado efeito das variáveis independentes.

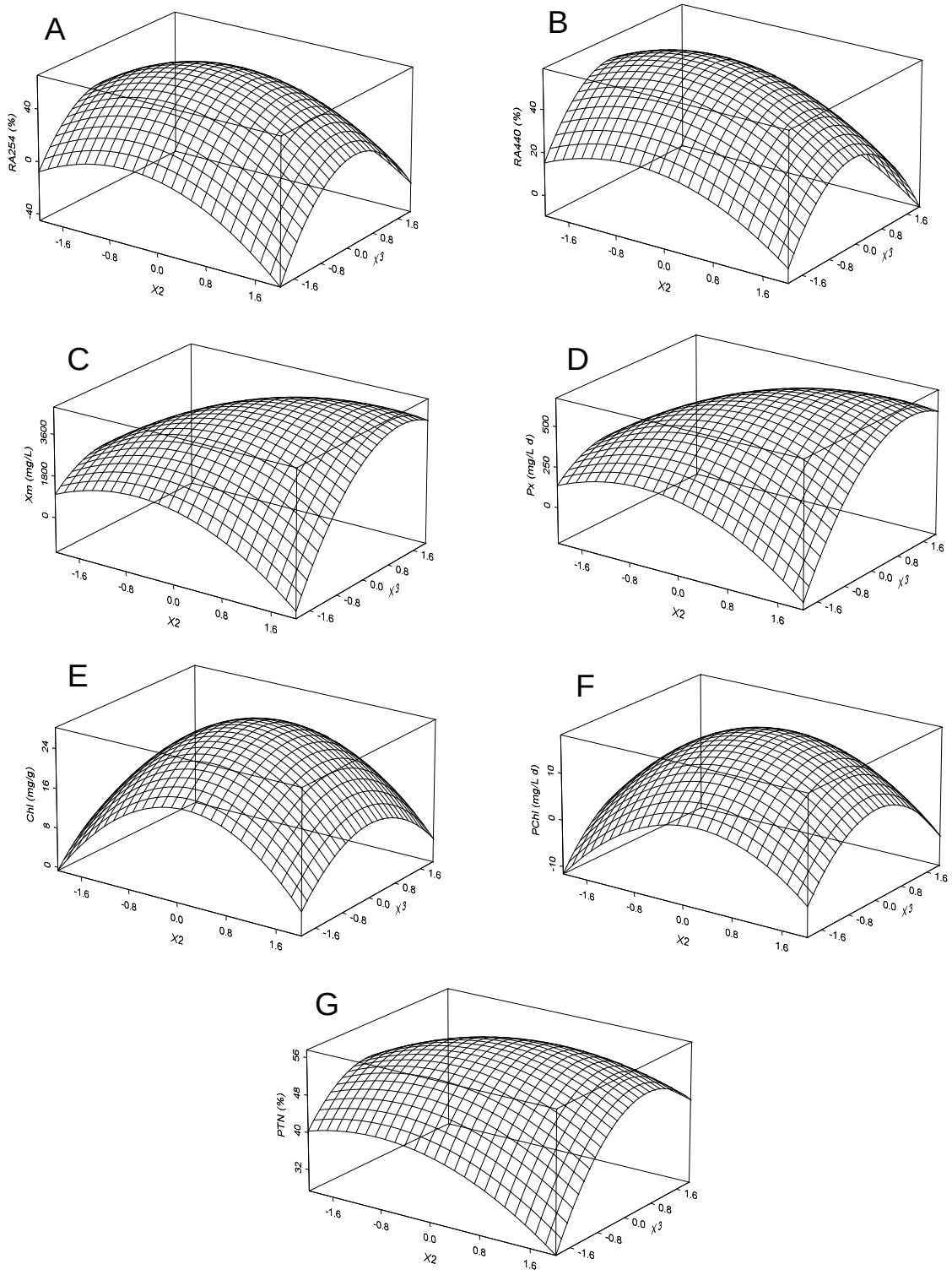

Gráfico 06 – Superfície de resposta de A. RA_{254}, B. RA_{440}, C. X_m, D. P_X, E. *Chl*, F. P_{Chl} e G. *PTN* em função dos valores codificados de quantidades de sulfato férrico (X_2) e tempo de contato (X_3) considerando a quantidade de carvão ativado em pó (X_1) no nível central do planejamento (*CAP* = 40,0 mg L^{-1}).

6.3 *Otimizacão das condições de tratamento de meio de cultivo proveniente de processo descontínuo alimentado com uso de cloreto férrico e carvão ativado granulado em coluna*

6.3.1 Remoção de matéria orgânica e pigmentos

A remoção de MO e clorofila-a usando *CAG* e *F* pode favorecer o crescimento de *A. platensis* nos meios reaproveitados após os tratamentos aplicados.

A floculação com *F* tem por objetivo aglomerar MO que se encontra em suspensão (ou em estado coloidal) e alguma MO que se encontra dissolvida, em partículas maiores que possam ser removidas posteriormente mediante a sua adsorção em partículas de *CAG*.

As variáveis independentes RA_{254} e RA_{440} foram estudadas para avaliar a remoção de MO e pigmentos, respectivamente. No caso de tratamento de águas, a presença de MO pode provocar uma redução da capacidade de ação dos carvões ativados pela presença de compostos que podem interferir no processo de adsorção de substâncias potencialmente tóxicas (EBIE et al., 2001). Isso evidencia a aplicabilidade do *CAG* para as remoções de MO e pigmentos nos meios a serem reaproveitados.

Na Tabela 07 são apresentados os valores de remoção de absorbância (RA_{254} e RA_{440}) nos diferentes tratamentos realizados segundo planejamento experimental adotado. O processo de floculação com *F* seguido de adsorção em coluna de *CAG* permitiram o sucesso nas remoções de MO (73 – 90 %) e de pigmentos (77 – 94 %).

Os maiores valores de remoção (RA_{440} e RA_{440}) foram atingidos nos testes de confirmação da otimização $CAGF_{20}$-$CAGF_{22}$ (90 % e 93 %, respectivamente). Esses resultados têm a mesma ordem de grandeza dos reportados por Odegaard (1979) que relataram remoção de sólidos suspensos entre 95 % e 98 % em águas residuárias.

A análise multivariável inicial foi feita utilizando os resultados da parte A da Tabela 07 para atingir o valor máximo de X_m. Porém, a solução matemática teve valores de *T* muito elevados (167,29 min) o que tornaria o processo inviável do ponto de vista industrial, apesar de que os valores de R^2 ajustado foram satisfatórios (0,75). Esse tipo de estimativa pode ocorrer em modelos matemáticos que visam à

obtenção de ponto de máximo quando ainda não foram atingidos os resultados apropriados nessa faixa de estudo. Assim, o planejamento experimental inicial foi expandido segundo Fratelli et al. (2005) para determinar o máximo valor matemático para *T*, devido a que a otimização do tempo de residência (*T*) é uma chave importante no processo, contribuindo para a diminuição de recursos econômicos no reuso de meio de cultivo de *A. platensis*. Dessa forma os testes $CAGF_{20}$ e $CAGF_{21}$ foram acrescentados no planejamento experimental.

A MSR aplicada aos valores de RA_{254} e RA_{440} (Tabela 07, Partes A e B) produz um modelo matemático apropriado ($P < 0,001$, em ambos os casos). O ajuste da regressão para RA_{254} tem valores negativos dos coeficientes quadráticos c_{11} e c_{12} (Tabela 08) que representam os valores de X_1, e X_2, respectivamente, mostrando o máximo valor de RA_{254} dentro da área da superfície de resposta. O valor de R^2 ajustado de 0,90 e o valor baixo de *P* ($P < 0,001$) confirmam sua significância estatística (Tabela 08).

O ajuste para os valores de RA_{440} (R^2 ajustado = 0,81, $P < 0,001$) tem o mesmo comportamento matemático que RA_{254} (Tabela 08). Os Gráficos 07A e 07B ilustram os gráficos de superfície de resposta de RA_{254} e RA_{440}, respectivamente, e os Gráficos 08C e 08D representam seus respectivos gráficos de contorno, em função de X_1 e X_2, mantendo X_3 no nível central do planejamento (T = 30,0 min).

6.3.2. Crescimento celular

6.3.2.1. P*arâmetros cinéticos*

A Tabela 07 mostra os resultados de crescimento celular de *A. platensis* nos meios após seus respectivos tratamentos (Partes A e B), bem como os testes adicionais com meios padrão e reaproveitado sem tratamento (Parte D). Os valores de X_m dos experimentos variam entre 1943 e 3281 mg L^{-1}. Como foi explicado anteriormente, cada meio tratado foi utilizado depois da reposição total da fonte de nitrogênio segundo o meio padrão Schlösser (1982). Assim, podemos dizer que o crescimento variou devido aos diferentes tratamentos empregados. Além disso, as concentrações finais de nitrato que foram medidas ao final dos experimentos foram muito baixas (0,03 – 0,1 g L^{-1}), como consequência do crescimento não limitado por carbono.

Tabela 07 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados com carvão ativado granulado e cloreto férrico segundo planejamento experimental, utilizando frascos Erlenmeyer.

Experimento	X_1[a]	X_2[b]	X_3[c]	*CAG*[d] (g)	*F* (mg L^{-1})	*T* (min)	RA_{254}[e] (%)	RA_{440}[f] (%)	X_m[g] (mg L^{-1})	Chl-a[h] (mg L^{-1})	*PTN*[i] (%)	*LIP*[j] (%)	P_X[k] (mg L^{-1} d^{-1})	*Chl*[l] (mg g^{-1})	P_{Chl}[m] (mg L^{-1} d^{-1})
Parte A: Planejamento experimental inicial															
$CAGF_1$	-1	-1	-1	70,0	6,0	20,0	88	92	2844	40	34,9	8,1	399	14	5,6
$CAGF_2$	1	-1	-1	130,0	6,0	20,0	83	81	2618	33	36,1	7,4	367	13	4,6
$CAGF_3$	-1	1	-1	70,0	14,0	20,0	80	79	2261	29	34,9	8,2	316	13	4,1
$CAGF_4$	1	1	-1	130,0	14,0	20,0	82	80	2241	30	33,2	7,7	313	13	4,1
$CAGF_5$	-1	-1	1	70,0	6,0	40,0	82	80	2203	29	38,9	7,4	308	13	4,0
$CAGF_6$	1	-1	1	130,0	6,0	40,0	83	81	2657	34	40,9	7,1	372	13	4,8
$CAGF_7$	-1	1	1	70,0	14,0	40,0	84	83	2736	27	41,3	8,3	384	10	3,7
$CAGF_8$	1	1	1	130,0	14,0	40,0	77	80	3140	45	39,9	7,1	441	14	6,3
$CAGF_9$	-1,687	0	0	49,4	10,0	30,0	89	92	2179	38	38,9	7,3	304	17	5,2
$CAGF_{10}$	1,687	0	0	150,6	10,0	30,0	82	80	2528	35	39,0	7,2	354	14	4,9
$CAGF_{11}$	0	-1,687	0	100,0	3,3	30,0	78	81	2017	20	38,6	8,1	281	10	2,7
$CAGF_{12}$	0	1,687	0	100,0	16,7	30,0	73	77	1943	18	37,8	7,7	270	9	2,6
$CAGF_{13}$	0	0	-1,687	100,0	10,0	13,1	92	94	2038	19	34,1	7,9	284	9	2,6
$CAGF_{14}$	0	0	1,687	100,0	10,0	46,9	90	93	3240	112	44,9	8,3	456	35	15,8
$CAGF_{15}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0	90	93	3024	96	43,9	8,5	425	32	13,5
$CAGF_{16}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0	90	93	3061	93	44,1	8,2	430	30	13,1
$CAGF_{17}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0	90	93	3048	91	44,2	8,0	428	30	12,7
$CAGF_{18}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0	90	93	3096	92	44,1	8,2	435	30	12,9
$CAGF_{19}$	0	0	0	100,0	10,0	30,0	90	93	3077	92	44,0	8,4	432	30	12,9
Parte B: Expansão do planejamento															
$CAGF_{20}$	0	0	3	100,0	10,0	60,0	90	93	3281	115	44,9	8,3	462	35	16,2
$CAGF_{21}$	0	0	5	100,0	10,0	80,0	90	93	3195	111	44,9	8,4	449	35	15,7

Continuacão Tabela 07

Parte C: Confirmação da Otimização															
$CAGF_{22}$	0,280	0	0,079	108,4	10,0	30,8	90	93	3054	107	44,9	8,3	429	35	15,1
$CAGF_{23}$	0,280	0	0,079	108,4	10,0	30,8	90	93	3161	112	44,9	8,3	444	35	15,7
$CAGF_{24}$	0,280	0	0,079	108,4	10,0	30,8	90	93	3204	114	44,9	8,3	451	35	16,0
Parte D: Experimentos adicionais															
$CAGF_{25}^{n}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2682	32	27,8	7,5	376	12	4,5
$CAGF_{26}^{n}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2531	31	27,8	7,2	354	12	4,3
$CAGF_{27}^{n}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2456	30	27,0	7,0	344	12	4,2
$CAGF_{28}^{o}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2901	36	31,2	8,2	407	12	5,1
$CAGF_{29}^{o}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2750	34	30,2	8,4	386	12	4,8
$CAGF_{30}^{o}$	-	-	-	-	-	-	-	-	2816	35	30,3	8,3	395	12	4,9

[a] Valores codificados de carvão ativado granulado (*CAG*)
[b] Valores codificados de quantidades de cloreto férrico (*F*)
[c] Valores codificados de tempo de residência (*T*)
[d] Massa de *CAG* (g) utilizada para tratamento de 2 L de meio exaurido
[e] Remoção de absorbância em comprimento de onda 254 nm
[f] Remoção de absorbância em comprimento de onda 440 nm
[g] Concentração máxima de biomassa
[h] Concentração de clorofila-a na suspensão celular
[i] Conteúdo total de proteínas na biomassa seca
[j] Conteúdo total de lipídeos na biomassa seca
[k] Produtividade celular
[l] Conteúdo de clorofila-a na biomassa seca
[m] Produtividade de clorofila-a
[n] Teste em meio padrão (SCHLÖSSER, 1982) com 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$
[o] Teste em meio exaurido após cultivo em batelada, sem tratamento prévio, com reposição de 2,5 g L^{-1} $NaNO_3$

Tendo em vista que o objetivo era otimizar o crescimento do micro-organismo no meio reaproveitado, o parâmetro X_m dos cultivos $CAPG_1$-$CAPG_{11}$ foram utilizados nessa otimização.

A equação obtida na análise de regressão para concentração celular máxima (X_m) foi:

$$X_m = 3006 + 87{,}69\ X_1 + 211{,}36\ X_3 - 177{,}84\ X_1^2 - 309{,}08\ X_2^2 - 36{,}27\ X_3^2 + 138\ X_1X_3 + 247\ X_2X_3 \qquad \text{(Equação 11)}$$

Após a derivação da Equação 11, chegou-se aos valores codificados X_1 = 0,28, X_2 = 0 e X_3 = 0,079 como os correspondentes pontos de ótimo. Esses valores representam, 108,4 g de carvão ativado granulado, 10 mg L^{-1} de cloreto férrico e 30,8 min de tempo de residência, respectivamente. Assim, os cultivos de ótimo ($CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$), foram realizados para confirmação do modelo, com estas condições pré-determinadas.

Tabela 08 – Coeficientes de correlação estimados pela Equação 08 na predição dos parâmetros RA_{254}, RA_{440}, X_m, *Chl*, *PTN*, P_X e P_{Chl}.

Parâmetro	RA_{254}	RA_{440}	X_m	*Chl*	*PTN*	P_X	P_{Chl}
y_i	i=1	i=2	i=3	i=4	i=5	i=6	i=7
a_i	90,33	92,64	3006	27,09	42,85	422,3	12,23
b_{ij}							
j=1	-1,520	-2,355	87,69	0	0	12,44	0
j=2	-1,566	-1,369	0	0	0	0	0
j=3	-0,272	0	211,36	2,184	3,016	30,22	1,889
c_{ij}							
j=1	-1,955	-3,208	-177,84	-5,056	-1,808	-25,39	-2,900
j=2	-5,479	-5,667	-309,08	-7,164	-2,072	-44,19	-3,602
j=3	0	0	-36,27	0	-0,574	-5,19	-0,249
$d_{ijj'}$							
jj'=1,2	0	0	0	0	-0,788	0	0
jj'=1,3	0	0	138	0	0	19,5	0
jj'=2,3	0	2	247	0	0	35,25	0
F_{calc}	35,23	18,24	11,64	21,33	24,19	11,62	22,01
R^2 ajustado	0,90	0,81	0,79	0,75	0,85	0,79	0,81
Valor *P*	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001	< 0,001	0,001	< 0,001

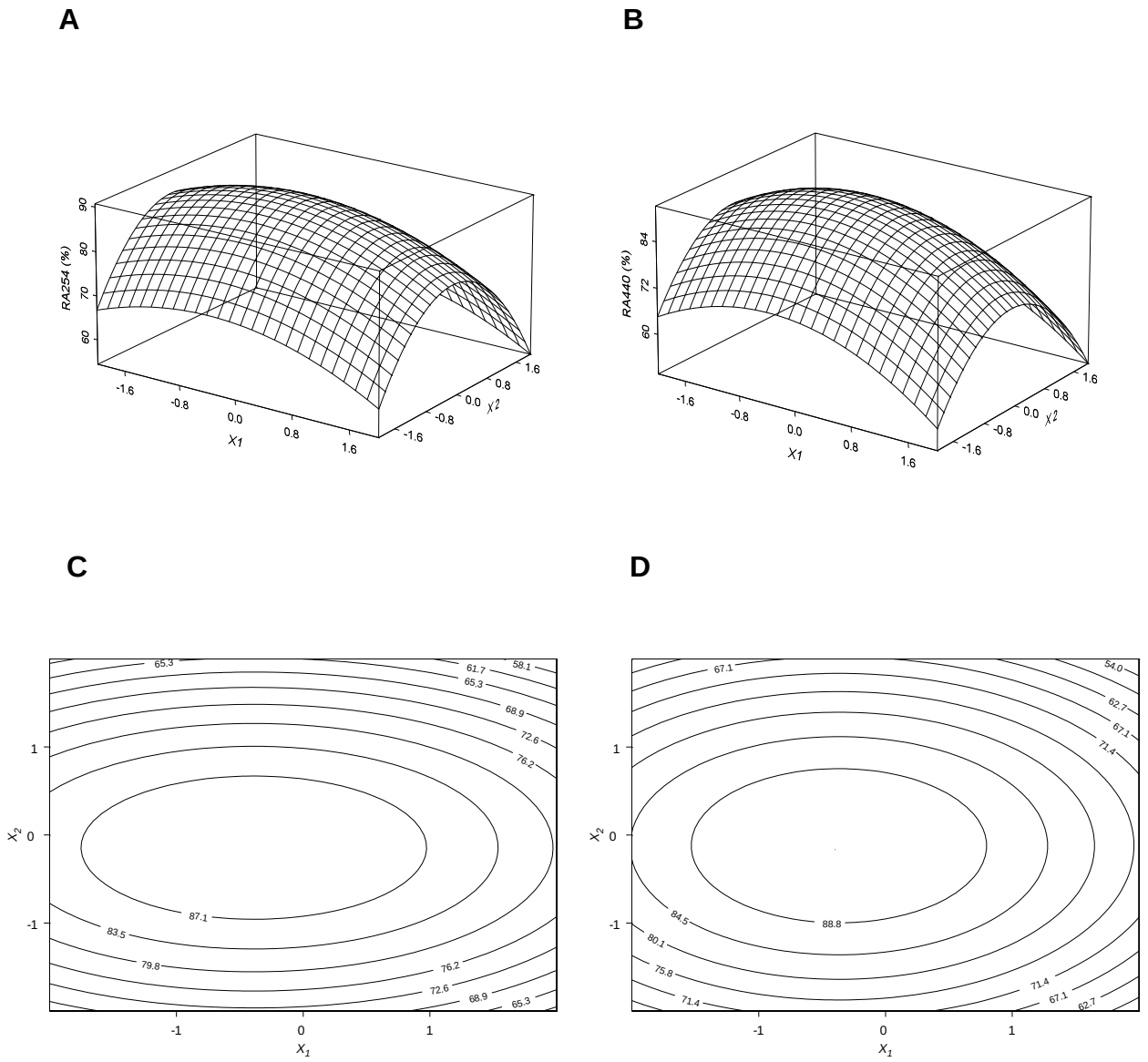

Gráfico 07 – Superfícies de resposta de: A. RA_{254}, B. RA_{440} e gráficos de contorno de: C. RA_{254} e D. RA_{440} em função dos valores codificados de quantidades de carvão ativado granulado (X_1) e cloreto férrico (X_2) considerando o tempo de residência (X_3) no nível central do planejamento (T = 30,0 min).

O valor médio da concentração celular máxima (X_m = 3140 ± 77 mg L^{-1}) dos experimentos de confirmação da otimização é 4 % maior do que o valor estimado a partir da Equação 11 (3030 mg L^{-1}), confirmando a utilidade da regressão multivariável na otimização das condições experimentais para maximização de X_m. Esses valores da Tabela 07, parte C (X_m = 3140 ± 77 mg L^{-1}) são 23 % maiores do que o valor médio dos testes realizados com meio padrão, $CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$ (Tabela 07, parte D) e também são 11 % maiores do que o valor médio dos testes realizados em meio reaproveitado sem tratamento, $CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$ (Tabela 07, parte D). Esses resultados confirmam a influência da remoção da MO no crescimento de *A. platensis* em meio reaproveitado após condições ótimas de *CAG*, *F* e *T*, bem como a validade da metodologia aplicada nesta parte do trabalho. Como comentado anteriormente, considerando ainda os resultados de X_m em condições otimizadas de tratamento, é importante mencionar que esse crescimento adicional pode ter sido decorrente também da presença de íon férrico residual.

O Gráfico 08 mostra que as curvas de crescimento dos experimentos de confirmação da otimização ($CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$) tem valor maior de X_m e, no entanto, os valores menores de X_m correspondem aos experimentos realizados com meio reaproveitado sem tratamento ($CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$). Esses valores diferentes de X_m foram atingidos provavelmente pela complexidade de fenômenos envolvidos nos processos de coagulação e floculação que produziram meios tratados com características próprias.

Rangel-Yagui et al. (2004), trabalhando com intensidades luminosas da ordem de até 5,60 klux (67,2 µmol fótons m^{-2} s^{-1}), verificaram que não havia limitação de nitrogênio em cultivos realizados com KNO_3 como fonte de nitrogênio. Considerando os cultivos realizados neste trabalho, onde foram empregadas intensidades luminosas bem maiores (120 µmol fótons m-^{2} s^{-1}), o consumo de nitrato foi maior provavelmente devido à maior energia fornecida aos cultivos. Observou-se nos cultivos adicionais com meio padrão ($CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$) e meio reaproveitado sem tratamento ($CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$), menor consumo de nitrato que nos outros experimentos, decorrente do menor crescimento celular. O consumo quase que total do nitrato adicionado nos cultivos indica a aplicabilidade dos tratamentos do planejamento experimental, nesta parte do trabalho.

Finalmente, analisando os valores de produtividade celular, confirma-se o determinado pelos valores de concentração celular máxima devido à relação existente entre X_m e P_X dada na Equação 05 e pela utilização do mesmo tempo de cultivo em todos os experimentos. Portanto, a regressão obtida para os valores de P_X (R^2 ajustado = 0,79, P = 0,001) tem a mesma análise que X_m (Tabela 08), podendo ser observada pelo mesmo perfil das superfícies de resposta encontradas (Gráficos 09A e 09B).

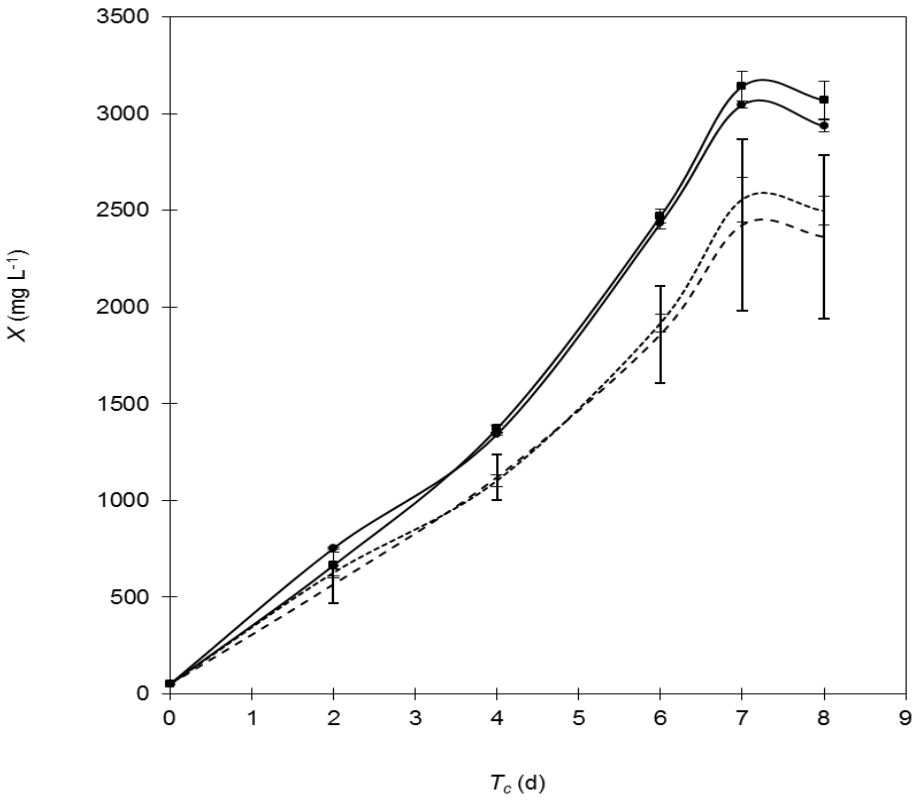

Gráfico 08 – Cultivo de *A. platensis* em frascos Erlenmeyers sob diferentes condições de tratamento. $CAGF_{15}$-$CAGF_{19}$: Testes do ponto central do desenho experimental (*CAG* = 100,0 g, *F* = 10,0 mg L^{-1}, *T* = 30,0 min (•), $CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$: Confirmação da otimização (*CAG* = 108,4 g, *F* = 10,0 mg L^{-1}, *T* = 30,8 min (■), $CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$: Meio padrão (---), $CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$: Meio reaproveitado sem tratamento (·····), barras de erro correspondem ao desvio padrão.

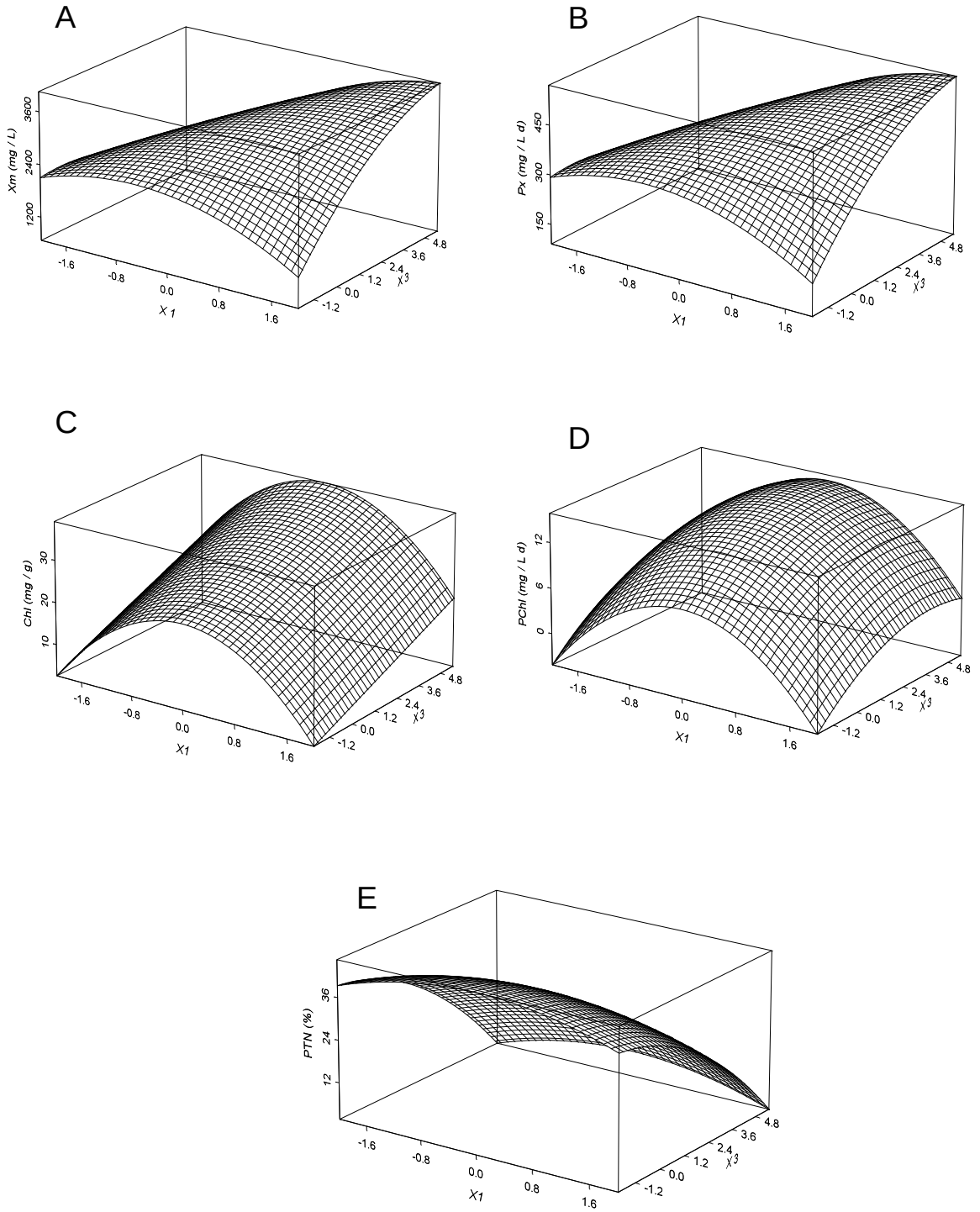

Gráfico 09 – Superfície de resposta de A. X_m, B. P_X, C. *Chl*, D. P_{Chl} e E. *PTN* em função dos valores codificados de quantidades de carvão ativado granulado (X_1) e tempo de residência (X_3) considerando a quantidade de cloreto férrico (X_2) no nível central do planejamento (F = 10,0 mg L^{-1}).

6.3.2.2 *Composição da biomassa*

6.3.2.2.1 Conteúdo de clorofila-a

Embora o meio reaproveitado tenha sido utilizado após a reposição de mesma quantidade de $NaNO_3$ como fonte de nitrogênio, os valores de clorofila-a atingidos no final do crescimento apresentaram diferentes valores (Tabela 07). O valor médio de conteúdo de clorofila-a na biomassa dos experimentos de confirmação da otimização ($CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$) (35 mg Chl-a g células^{-1}) foi maior em 192 % do que o valor dos testes em meio padrão ($CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$) e meio reaproveitado sem tratamento ($CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$) (12 mg Chl-a g^{-1} células, para ambos). Assim, os maiores valores de produtividade em clorofila-a (15,6 ± 0,5 mg L^{-1} d^{-1}) foram atingidos nesses experimentos de otimização.

Devido à relação entre *Chl* e P_{Chl} dada nas Equações 06 e 07, a regressão para ambos os parâmetros têm o mesmo comportamento. O ajuste na regressão de *Chl* e P_{Chl} (R^2 ajustado = 0,75 e 0,81, respectivamente, $P < 0,001$ em ambos casos) tem valores negativos dos coeficientes quadráticos. Os coeficientes lineares b_{41}, b_{42}, b_{71} e b_{72} bem como todos os coeficientes das interações foram eliminados devido a que foram considerados não significativos estatisticamente.

Os Gráficos 09C e 09D ilustram os gráficos de superfície de resposta de *Chl* e P_{Chl}, respectivamente, em função de X_1 e X_3, mantendo X_2 no nível central do planejamento (F = 10,0 mg L^{-1}).

6.3.2.2.2 Conteúdo de lipídeos e proteínas

Os teores de lipídeos obtidos nos pontos de ótimo são de 8,3 % (Tabela 07, parte C), sendo esses resultados, da mesma ordem de grandeza que o obtido (7,2 %) por Rafiqul, Jalal e Alam (2005) em cultivo de *A. platensis* em FBR fechado sob diferentes condições ambientais como luz, temperatura e pH. Porém, os conteúdos totais de lipídeos obtidos nesta parte do trabalho são menores do que os valores (19,2 – 20,9 %) reportados por Rodrigues et al. (2010), que usaram nitrato de potássio e cloreto de amônio simultaneamente em FBR abertos, evidenciando a influência das condições ambientais na produção de lipídeos.

Foi feita a regressão multivariável com os valores de lipídeos totais, *LIP* (Tabela 07, partes A e B), mas os resultados não foram influenciados pelas condições experimentais e, portanto, esses resultados não foram apresentados neste trabalho.

Por outro lado, é bem conhecido que o conteúdo de proteínas de muitas cianobactérias é afetado pelos diversos fatores nutricionais e ambientais presentes no cultivo (OLGUÍN et al., 2001). Assim, Sassano (2004) demonstrou que os teores de proteínas nas biomassas decaíram significativamente, a valores que chegaram a 16,5 %, em cultivos realizados sob limitação de nitrogênio.

O valor do teor de proteínas na biomassa dos cultivos de confirmação da otimização ($CAGF_{22}$-$CAGF_{24}$) foi 44,9 %, sendo esse valor maior do que aqueles atingidos nos experimentos em meio padrão ($CAGF_{25}$-$CAGF_{27}$) (27,5 ± 0,5 %) e meio reaproveitado sem tratamento ($CAGF_{28}$-$CAGF_{30}$) (30,6 ± 0,6 %). Assim, fica evidenciado que o tratamento do meio nas condições estabelecidas para otimização de crescimento celular também tem efeitos benéficos no teor proteico da biomassa produzida.

A Tabela 08 mostra os valores dos coeficientes da regressão multivariável de *PTN*. Os valores negativos dos coeficientes quadráticos mostram a existência de um ponto máximo dentro da área de superfície de resposta. O Gráfico 09E apresenta a superfície de resposta dos valores codificados de *PTN*, considerando os valores codificados de *CAG* (X_1) e *T* (X_3), mantendo *F* (X_2) no nível central do planejamento (F = 10,0 mg L^{-1}).

Os valores de teor proteico encontrados nesta parte do trabalho também são maiores que os valores (28 – 38 %) reportados por Ferreira et al. (2010), que trabalharam com FBR tubulares usando processo de batelada alimentada e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Adicionalmente, esses valores são da mesma ordem de grandeza dos valores (27,3 – 43,7 %) reportados por Bezerra et al. (2008), que trabalharam com FBR aberto e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Isso indica que nesses ensaios houve disponibilidade de nitrogênio suficiente tanto para o crescimento celular quanto para a produção de nitrogênio orgânico, na forma de proteínas, como material de reserva da célula.

Finalmente, os valores de proteína atingidos neste trabalho são menores dos valores (49,3 – 51,5 %) reportados por Rodrigues et al. (2010) que avaliaram o uso simultâneo de nitrato de potássio e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio em FBR abertos, provavelmente pelo fato destes autores terem trabalhado com duas fontes de nitrogênio complementares.

6.4 *Utilização dos meios tratados em condições ótimas em fotobiorreator tubular*

6.4.1 Crescimento celular em fotobiorreator tubular

Procurando verificar se as condições de otimização de tratamento de meio obtidas para cultivos em frascos Erlenmeyer poderiam ser aplicadas para cultivos em FBR tubulares, que apresentam maior demanda de nutrientes, o meio tratado em condições ótimas também foi testado em FBR tubulares de 3,5 L.

Como comentado anteriormente, no tratamento com *CAG* e *F*, os valores experimentais de X_m após condições ótimas de tratamento quando usados frascos Erlenmeyers foram maiores do que os valores em meio padrão. No entanto, em FBR tubulares, os valores de X_m (4033 ± 110 mg L^{-1}, Tabela 09) atingidos em meio tratado com *CAG* e *F* foram menores ($P < 0,001$, Tabela 09) do que os valores (4241 ± 84 mg L^{-1}, Tabela 09) em meio padrão.

Por outro lado, a Tabela 09 e o Gráfico 10 mostram que os valores de X_m e P_X dos cultivos realizados em meios tratados com *CAP* e *F* ou *CAP* e *S* foram maiores ($P < 0,001$, Tabela 09) do que os valores em meio padrão. Estes valores permitem afirmar que as condições ótimas dos tratamentos produziram meios apropriados a serem reusados em maior escala, já que o FBR tubular precisa de maior consumo de nutrientes devido à elevada produtividade celular (Tabela 09) nesse tipo de sistema de cultivo.

Tabela 09 – Crescimento de *A. platensis* em meios tratados utilizando FBR tubulares. [a,b]

Meio de cultivo	X_m [d] (mg L^{-1})	Chl-a [e] (mg L^{-1})	*PTN* [f] (%)	*LIP* [g] (%)	$(NO_3)^-$ [h] (g L^{-1})	P_x [i] (mg L^{-1} d^{-1})	*Chl* [j] (mg g^{-1})
Tratado com *CAP* e *F*, Item 6.1	4991 ± 161 [A]	102,3 ± 1,0 [A]	53,8 ± 1,3 [A]	7,5 ± 0,1 [B]	0,04 ± 0,02 [A]	656 ± 23 [A]	20,5 ± 0,7 [A]
Tratado com *CAP* e *S*, Item 6.2	4658 ± 117 [B]	96,0 ± 2,1 [B]	57,3 ± 2,5 [A]	7,7 ± 0,2 [AB]	0,06 ± 0,02 [A]	608 ± 17 [B]	20,6 ± 0,7 [A]
Tratado com *CAG* e *F*, Item 6.3	4033 ± 110 [C]	38,9 ± 2,3 [C]	47,3 ± 2,6 [B]	7,9 ± 0,3 [AB]	0,06 ± 0,01 [B]	519 ± 16 [C]	9,7 ± 0,3 [B]
Padrão (SCHLÖSSER, 1982)	4241 ± 84 [C]	32,8 ± 1,7 [D]	34,8 ± 2,6 [C]	8,1 ± 0,3 [A]	0,04 ± 0,01 [C]	549 ± 12 [C]	7,7 ± 0,3 [C]
Valor *P* [c]	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,023	< 0,001	< 0,001	< 0,001

[a] Média dos testes realizados em triplicata
[b] Diferentes letras maiúsculas foram usadas para as médias estatisticamente diferentes, para cada resposta avaliada, segundo teste de Tukey
[c] Valor *P* obtido de ANOVA
[d] Concentração máxima de biomassa
[e] Concentração de clorofila-a na suspensão celular
[f] Conteúdo total de proteínas na biomassa seca
[g] Conteúdo total de lipídeos na biomassa seca
[h] Concentração final de nitrato
[i] Produtividade celular
[j] Conteúdo de clorofila-a na biomassa seca

6.4.2 Composição de biomassa obtida em fotobiorreator tubular

Os valores de *LIP* na biomassa obtida a partir de FBR tubulares utilizando meio tratado em três condições (*CAP e F*, *CAP e S ou CAG e F*) são estatisticamente iguais. Porém, os testes com uso de *CAP* e *F* levaram à formação de biomassa com *LIP* menor que o cultivo padrão (Tabela 09). Confirmou-se que esses resultados são da mesma ordem de grandeza que o valor obtido (7,2 %) por Rafiqul, Jalal e Alam (2005) que cultivaram *A. platensis* em FBR fechado utilizando diferentes condições de intensidade luminosa, temperatura e pH.

A Tabela 09 mostra que os valores de *PTN* e *Chl* em FBR tubulares com meios reaproveitados são maiores do que os valores atingidos em meio padrão, sendo o melhor tratamento com *CAP* e *S*. Portanto, é possível inferir que as condições ótimas de tratamento podem favorecer o incremento da qualidade nutricional da biomassa inclusive em FBR de maior escala.

Os valores de *PTN* em FBR tubular após os tratamentos testados são maiores que os valores reportados por Ferreira et al. (2012), que utilizaram sulfato de amônio e nitrato de sódio, simultaneamente, atingindo valores de 30,7 % de teores de proteínas com associação de 75 % $NaNO_3$ e 25 % $(NH_4)_2SO_4$.

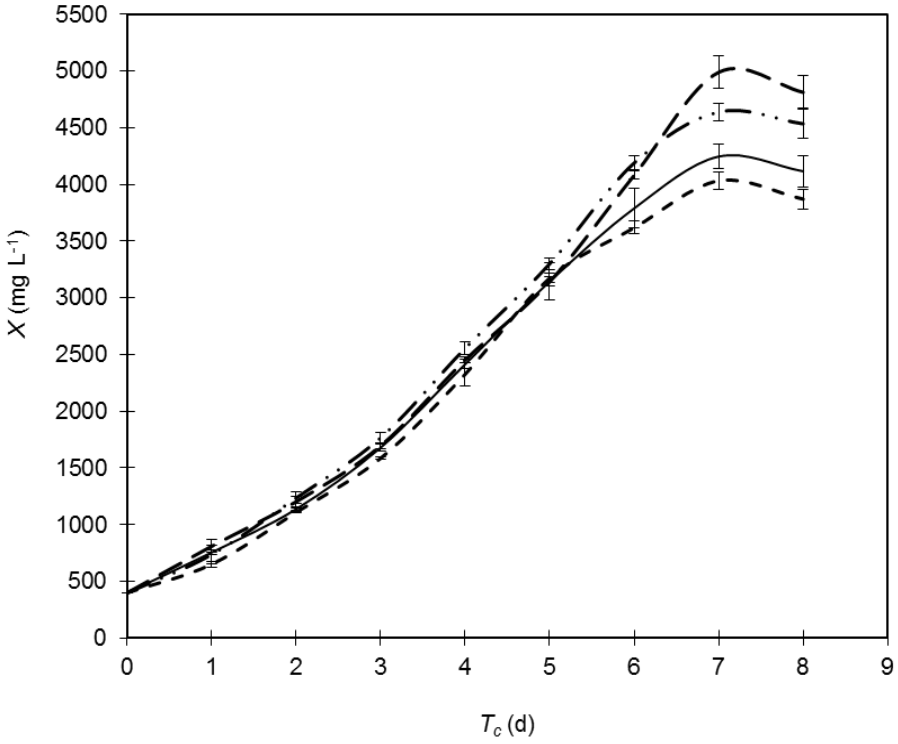

Gráfico 10 – Crescimento celular durante o cultivo de *A. platensis* em meios tratados usando FBR tubulares. Meio tratado com *CAP* e *F* (– –), Meio tratado com *CAP* e *S* (– · ·); Meio tratado com *CAG* e *F* (----), Meio padrão (——), barras de erro correspondem ao desvio padrão.

6.5 *Tratamento contínuo de meio com carvão ativado granulado e simultâneo uso do meio tratado em processo contínuo de cultivo*

Neste sub-item, são apresentados os resultados de um processo de produção contínua de *A. platensis* em FBR tubular em que a suspensão celular é continuamente filtrada para remoção e colheita das células produzidas e o meio exaurido é também continuamente tratado em coluna com *CAG*, sendo incorporado ao sistema o meio tratado em diferentes proporções. Maiores detalhamentos das condições de cultivo contínuo e de tratamento de meio são encontrados nos itens 4.4.1.2 e 4.4.2.1.4, respectivamente, sendo o valor do pH do meio misto fixado em 9,0 ± 0,1 (item 4.2).

6.5.1 Cultivo contínuo com meio fresco

A Tabela 10 mostra os resultados de cultivo contínuo de *A. platensis* na primeira condição de estado estacionário (C_a) em meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia, sendo a representação gráfica desta condição apresentada no Gráfico 11. A segunda e terceira condições, C_b e C_c, respectivamente (Gráfico 11) utilizaram meio misto, meio resultante da mistura de meio fresco contendo 3,1 mmol L^{-1} ureia como fonte de nitrogênio e de meio tratado sem (C_b) ou com (C_c) adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia (Tabelas 11 e 12, respectivamente).

O processo contínuo foi precedido por cultivo descontínuo alimentado até o quinto dia de cultivo (Gráfico 11) para atingir uma concentração celular um pouco maior do que a correspondente àquela primeira condição de estado estacionário (MATSUDO et al., 2011), permitindo assim, diminuir o tempo para atingir dita condição. De um modo geral, apenas dois dias foram necessários para atingir esta primeira condição após ter começado o processo contínuo sem reuso de meio (C_a, Gráfico 11) e o estado estacionário nesta condição foi atingida entre o sétimo e décimo dia de cultivo. Como descrito no item 4.4.2.1.4 e sendo C_a igual em todos os experimentos, confirma-se que não houve diferença estatística entre as médias.

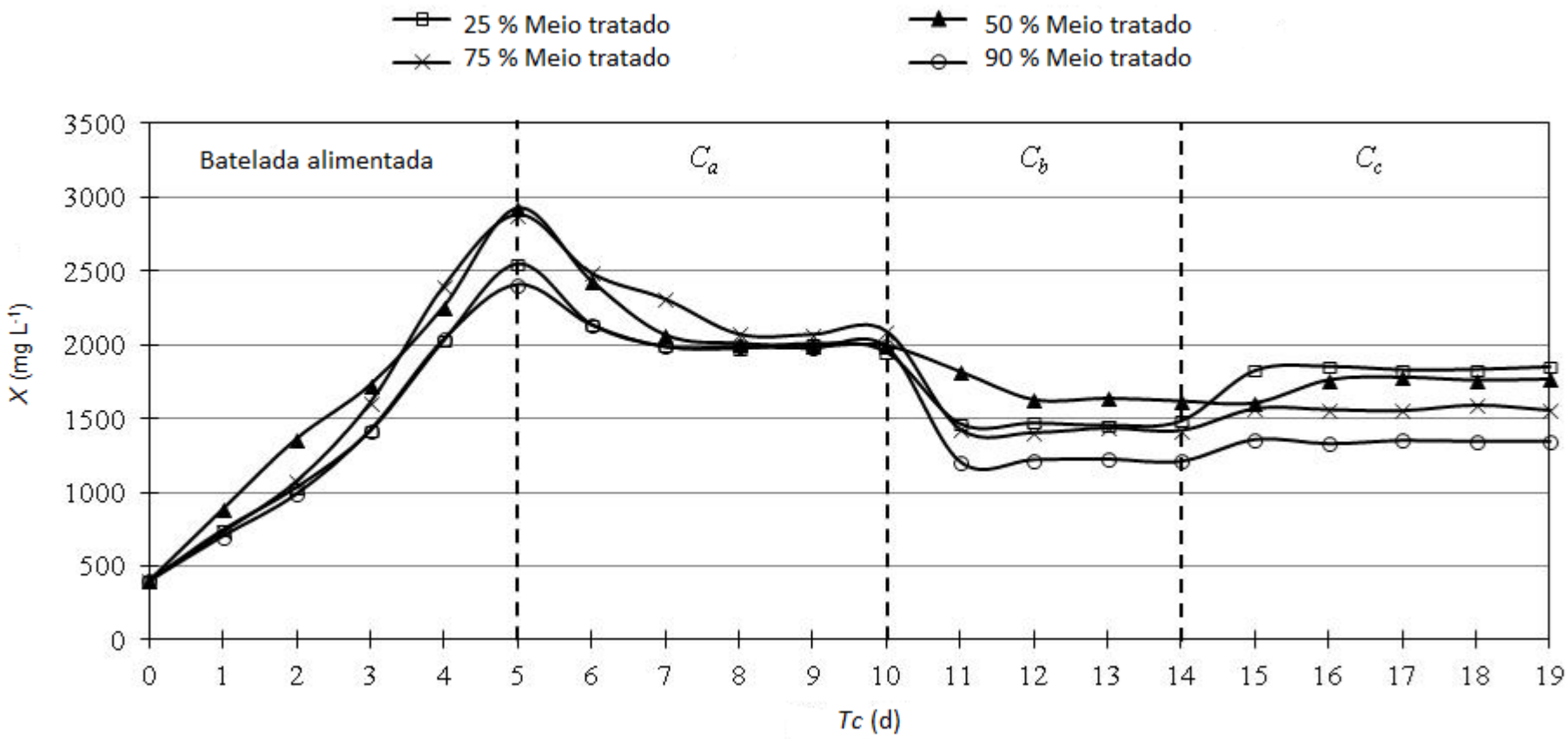

Gráfico 11 – Concentração celular em função do tempo de cultivo contínuo de *A. platensis* utilizando diferentes proporções de meio tratado, sem adição, C_b, ou com adição, C_c, de ureia. Cada uma dessas condições foi precedida por uma etapa de cultivo descontínuo alimentado (0 a 5 dias) e uma etapa de processo contínuo onde se utilizou apenas meio fresco (5 a 10 dias) (C_a).

Tabela 10 – Resultados experimentais de cultivo contínuo de *A. platensis* em estado estacionário usando meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia (C_a) e vazão específica de alimentação (D) de 0,6 d^{-1}.

Experimento[a]	X_{Sa}[b] (mg L^{-1})	P_{Xa}[c] (mg L^{-1} d^{-1})	PTN_a[d] (%)
EC_1	1981 ± 29	1189	46 ± 0,2
EC_2	1998 ± 10	1199	43 ± 0,5
EC_3	2082 ± 13	1249	41 ± 0,3
EC_4	1988 ± 6	1193	36 ± 0,6

[a] Experimentos de cultivo contínuo 1 – 4 correspondem à mesma condição experimental (C_a), porém prévios aos cultivos contínuos usando 25, 50, 75 e 90 % de meio tratado, respectivamente

[b] Concentração celular na primeira condição de estado estacionário, meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia

[c] Produtividade celular na primeira condição de estado estacionário, meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia

[d] Conteúdo de proteína na biomassa na primeira condição de estado estacionário, meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia

6.5.2 Remoção de matéria orgânica e pigmentos

Os valores de RA_{254} foram maiores do que os valores de RA_{440} nas duas condições apresentadas, sem (C_b) ou com (C_c) adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia no meio tratado (Tabela 11).

A Tabela 11 mostra que os valores de absorbância dos meios mistos, $A254_{Mis}$ e $A440_{Mis}$, têm uma relação direta com a proporção do meio tratado, ou seja, quando maior for a proporção de meio tratado, maior é a absorbância do meio misto.

O Gráfico 11 demonstra que a remoção de MO e pigmentos pode favorecer o crescimento celular se associado ao reciclo de até 50 % de meio, desde que ocorra a adição da concentração de ureia no meio tratado. De fato, é possível atingir valor de concentração celular da ordem de 1800 mg L^{-1} em estado estacionário quando foi usado 50 % ou menor proporção de meio tratado, mas sempre com adição da concentração de ureia em todos os experimentos (Tabela 12).

Tabela 11 – Remocão de absorbância 254 nm (RA_{254}) e 440 nm (RA_{440}) com carvão ativado granulado no cultivo contínuo de *A. platensis* sem (C_b) e com (C_c) adição de ureia no meio tratado.[a]

Experimento	Meio tratado (%)	Meio fresco (%)	Condição	$A254_{BT}$[b] (cm^{-1})	$A254_{AT}$[c] (cm^{-1})	$A254_{Mis}$[d] (cm^{-1})	$A440_{BT}$[e] (cm^{-1})	$A440_{AT}$[f] (cm^{-1})	$A440_{Mis}$[g] (cm^{-1})	RA_{254}[h] (%)	RA_{440}[i] (%)
EC_1	25	75	C_{1b}	1,012 ± 0,004	0,293 ± 0,004	0,077 ± 0,006	0,274 ± 0,007	0,123 ± 0,006	0,045 ± 0,006	71,1 ± 0,5	55,2 ± 3,5
EC_2	50	50	C_{2b}	1,014 ± 0,008	0,284 ± 0,006	0,233 ± 0,008	0,281 ± 0,016	0,118 ± 0,011	0,084 ± 0,007	72,0 ± 0,9	57,8 ± 6,4
EC_3	75	25	C_{3b}	1,013 ± 0,006	0,283 ± 0,011	0,356 ± 0,005	0,261 ± 0,010	0,124 ± 0,007	0,120 ± 0,005	72,1 ± 0,9	52,5 ± 0,9
EC_4	90	10	C_{4b}	1,014 ± 0,007	0,292 ± 0,009	0,374 ± 0,006	0,264 ± 0,013	0,127 ± 0,008	0,155 ± 0,004	71,2 ± 1,1	52,0 ± 5,3
EC_1	25	75	C_{1c}	1,085 ± 0,021	0,256 ± 0,009	0,083 ± 0,016	0,289 ± 0,011	0,123 ± 0,006	0,055 ± 0,006	76,4 ± 0,4	57,4 ± 0,3
EC_2	50	50	C_{2c}	1,274 ± 0,010	0,274 ± 0,004	0,114 ± 0,009	0,323 ± 0,016	0,134 ± 0,008	0,089 ± 0,014	78,5 ± 0,5	58,6 ± 0,3
EC_3	75	25	C_{3c}	1,387 ± 0,008	0,365 ± 0,004	0,241 ± 0,012	0,383 ± 0,009	0,182 ± 0,003	0,111 ± 0,011	73,7 ± 0,1	52,4 ± 0,4
EC_4	90	10	C_{4c}	1,445 ± 0,006	0,407 ± 0,006	0,311 ± 0,012	0,420 ± 0,013	0,204 ± 0,006	0,132 ± 0,010	71,9 ± 0,6	51,4 ± 0,2

[a] Os valores na Tabela correspondem à média ± desvio padrão (duplicata das determinações analíticas)
[b] Absorbância 254 nm antes do tratamento
[c] Absorbância 254 nm após do tratamento
[d] Absorbância 254 nm do meio misto
[e] Absorbância 440 nm antes do tratamento
[f] Absorbância 440 nm após do tratamento
[g] Absorbância 440 nm do meio misto
[h] Remoção de absorbância 254 nm
[I] Remoção de absorbância 440 nm

Tabela 12 – Resultados de cultivo contínuo de *A. platensis* sem (C_b) e com (C_c) adição da concentração de ureia no meio tratado.[a]

Experimento	Meio tratado (%)	Meio fresco (%)	X_{Sb}[b] (mg L^{-1})	X_{Sc}[c] (mg L^{-1})	P_{Xb}[d] (mg L^{-1} d^{-1})	P_{Xc}[e] (mg L^{-1} d^{-1})	PTN_b[f] (%)	PTN_c[g] (%)
EC_1	25	75	1471 ± 12	1842 ± 12	883	1105	30 ± 4,0	45 ± 0,5
EC_2	50	50	1676 ± 95	1736 ± 72	1006	1042	39 ± 0,4	43 ± 0,6
EC_3	75	25	1425 ± 14	1568 ± 15	855	941	33 ± 0,7	42 ± 0,6
EC_4	90	10	1219 ± 8	1349 ± 11	731	809	23 ± 1,3	34 ± 0,8

[a] Os valores na Tabela correspondem à média ± desvio padrão (duplicata das determinações analíticas)
[b] Concentração celular na segunda condição, com meio misto sem adição de ureia no meio tratado
[c] Concentração celular na terceira condição, com meio misto e adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia
[d] Produtividade celular na segunda condição, com meio misto sem adição de ureia no meio tratado
[e] Produtividade celular na terceira condição, com meio misto e adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia
[f] Conteúdo total de proteína na segunda condição, com meio misto sem adição de ureia no meio tratado
[g] Conteúdo total de proteína na terceira condição, com meio misto e adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia

Numa analise conjunta das condições C_b e C_c, MANOVA demonstrou que os valores médios de RA_{254} não apresentaram diferença estatística quando foram utilizadas diferentes proporções de meio (P = 0,539, Tabela 13), sendo nítida uma influência do efeito do reuso do meio tratado na concentração celular em regime permanente (estacionário). O teor de proteínas, no entanto, somente teve seu valor menor com uso de 90 % de meio tratado (Tabela 13). A adição de nitrogênio nas condições C_b e C_c teve influência nos valores de RA_{254} (P = 0,003, Tabela 14). Por outro lado, as proporções de meio utilizadas tiveram influência nos valores de RA_{440} (P = 0,020, Tabela 13). Porém os valores de RA_{440} não foram influenciados pelas duas últimas condições aplicadas, sem (C_b) e com (C_c) adição da concentração de ureia no meio tratado (P = 0,694, Tabela 14).

Tabela 13 – Média de RA_{254}, RA_{440}, X_S e *PTN* obtidos por MANOVA para o cultivo contínuo de *A. platensis* sem (C_b) e com (C_c) adição da concentração de ureia no meio tratado.[a,b]

Meio tratado (%)	RA_{254} (%)	RA_{440} (%)	X_s (mg L^{-1})	*PTN* (%)
25	74,2 [A]	56,4 [A]	1669 [A]	37,7 [A]
50	75,3 [A]	58,2 [B]	1742 [A]	40,8 [A]
75	72,3 [A]	52,5 [A]	1496 [B]	37,7 [A]
90	71,5 [A]	51,7 [C]	1283 [C]	28,8 [B]
Valor P^c	0,539	0,020	< 0,001	< 0,001

[a] Média dos testes realizados nas duas últimas condições (C_b e C_c)
[b] Diferentes letras maiúsculas foram usadas para as médias estatisticamente diferentes, para cada resposta avaliada, segundo MANOVA
[c] Valor *P* obtido de MANOVA, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$ (nível de confiança > 95 %)

Tabela 14 – Média de RA_{254} e RA_{440} obtidos por MANOVA para o cultivo contínuo de *A. platensis* usando quatro proporções de meio tratado (25, 50, 75 e 90 %).[a,b]

Condição	RA_{254} (%)	RA_{440} (%)
C_b, sem adição de ureia	71,6 [A]	54,4 [A]
C_c, com adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia	75,0 [B]	55,0 [A]
Valor P^c	0,003	0,694

[a] Médias dos testes usando todas as proporções de meio (25, 50, 75 e 90 %)
[b] Diferentes letras maiúsculas foram usadas para as médias estatisticamente diferentes, para cada resposta avaliada, segundo MANOVA
[c] Valor *P* obtido de MANOVA, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$ (nível de confiança > 95 %)

6.5.3 Cultivo contínuo usando diferentes proporções de meio tratado

Após o cultivo contínuo utilizando apenas meio fresco (item 6.5.1), a suspensão celular passou por um processo de filtração celular seguido de tratamento do meio exaurido em coluna com *CAG* e o meio tratado foi coletado continuamente para posteriormente ser reutilizado em diferentes proporções como já descrito. O meio tratado foi adicionado em duas condições, sem (C_b) ou com (C_c) adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia, como descrito no item 6.5.1.

A Tabela 12 mostra que independente da condição de reuso de meio, adicionando (C_c) ou não (C_b) ureia (3,1 mmol L^{-1}) no meio tratado, a concentração celular no estado estacionário (X_s) diminui do teste EC_1 (25 % meio tratado) até o teste EC_4 (90 % meio tratado). O meio misto sem adição de ureia no meio tratado leva a valores baixos de X_s na segunda condição (P < 0,001, Tabela 13) e, consequentemente, produz valores baixos de P_X. A concentração celular foi incrementada pela adição da concentração de ureia no meio tratado utilizando o meio misto, no decimo quarto dia de cultivo (C_c, Gráfico 11), evidenciando assim a necessidade da adição de ureia para manter o crescimento celular no mesmo nível correspondente ao meio fresco com 3,1 mmol L^{-1} ureia.

No decorrer dos testes, a correção de pH no meio misto (9,0 ± 0,1) ajudou na reposição de carbono no meio de alimentação para permitir a operação do sistema sem adição de CO_2 durante o cultivo contínuo. Assim, a correção prévia de pH foi apropriada em escala laboratorial e pode ser aplicada em escalas maiores, devido a que a correção de pH foi favorecida pela ausência de células e não foi preciso aplicar condições severas de solubilização de CO_2.

Sendo *A. platensis* um micro-organismo alcalofílico que cresce em pH entre 9 – 10 (SANCHEZ-LUNA et al., 2007), uma diminuição nos valores de X_s não é devida à variação de pH, mas a queda nos valores de X_s na segunda condição (C_b, Gráfico 11) é devida à deficiência de nitrogênio, caracterizada pelos valores de amônia muito abaixo dos limites de detecção da metodologia (1 x 10^{-6} mmol L^{-1} amônia), em qualquer das proporções de meio tratado utilizadas. De fato, esse valor é bem menor do que os valores considerados como tóxicos (10,0 mmol L^{-1}) (BELKIN; BOUSSIBA, 1991) ou inibitórios (6,4 mmol L^{-1}) (CARVALHO et al., 2004) para este micro-organismo.

O incremento de X_s após o décimo quarto dia de cultivo (C_c, Gráfico 11) foi pela adição de nitrogênio no meio tratado, sendo a concentração de amônia abaixo de 7,8 x 10^{-5} mmol L^{-1}, independente da proporção de meio tratado. A pesar da adição da concentração de ureia no meio tratado, o que levou a uma concentração deste nutriente quase equivalente à usada no meio fresco, utilizado na condição C_a, o sistema não voltou à primeira condição de estado estacionário devido, provavelmente, à presença de MO e pigmentos, expressos como $A254_{Mis}$ e $A440_{Mis}$, respectivamente, no meio de alimentação quando o meio foi tratado e reusado

(Tabela 11) e/ou pela limitação de outros nutrientes no meio, como os micro-nutrientes, por exemplo.

Embora não se tenham estudos que avaliem o reuso de meio no cultivo contínuo de *A. platensis* em FBR tubular, há poucos estudos avaliando o uso de fontes de nitrogênio baratas como ureia em sistema contínuo (MATSUDO et al., 2011; MATSUDO et al., 2012) bem como em processo em batelada (MOROCHO-JÁCOME et al., 2012). Este estudo demonstrou que o cultivo contínuo com 50 % de meio tratado pode atingir valores de P_X iguais a 1006 mg L^{-1} (Tabela 12) na pior condição aplicada (C_b, Gráfico 11), ou seja, sem adição de nitrogênio no meio tratado.

Há uma queda linear em X_s com o incremento da proporção de meio tratado. Esta relação pode ser explicada pela inclinação negativa da equação y = 1959 - 6.628 x (R^2 = 0,87), onde o coeficiente de correlação tem valores apropriados para processos biológicos (FRATELLI et al., 2005; SILVA; ROBERTO, 2001).

A influência das proporções de meio tratado e da adição de ureia no crescimento celular no estado estacionário (X_s) foi confirmado por MANOVA (P < 0,001 em ambos os casos, Tabelas 13 e 14, respectivamente). Não há diferença estatística entre as médias de X_s até 50 % de meio tratado, mas a média de X_s com 90 % de meio tratado levou ao mais baixo valor de X_s (Tabela 13). Particularmente, a diferença de X_s é quase 30 % quando comparados os valores de concentração celular em regime permanente com reuso de 90 % de meio tratado (1283 mg L^{-1}) e 25 % de meio tratado (1669 mg L^{-1}).

A Tabela 15 mostra que os valores de X_s foram estatisticamente diferentes nas duas últimas condições (C_b e C_c) e, como esperado, a melhor condição foi a última, com adição da concentração da fonte de nitrogênio no meio tratado.

6.5.4 Avaliação de biomassa

6.5.4.1 *Conteúdo de lipídeos*

O conteúdo total de lipídeos nos experimentos desta parte do trabalho atingiram valores entre 7,9 – 8,7 %. Assim, as condições experimentais deste trabalho não influenciaram no conteúdo total de lipídeos como foi determinado por Morocho-Jácome et al. (2012), que estudaram a influência de diferentes

temperaturas e adição molar de ureia no cultivo em batelada de *A. platensis*, com conteúdo de lipídeos na biomassa de 6,33 % até 9,85 %.

Porém, os valores de lipídeos são menores do que aqueles (19,2 – 20,9 %) relatados por Rodrigues et al. (2010), que usaram nitrato de potássio e cloreto de amônio simultaneamente em FBR abertos, e do valor (7,2 %) reportado por Rafiqul, Jalal e Alam (2005) que avaliaram as condições ótimas de intensidade luminosa, temperatura e pH no crescimento de *Spirulina* sp. usando ureia em FBR fechado. Em ambos os casos, os cultivos foram realizados sempre com meio padrão fresco e sem reuso do mesmo.

Tabela 15 – Média de X_S e *PTN* obtidos por MANOVA para o cultivo de *A. platensis* usando quatro proporções de meio tratado (25, 50, 75 e 90 %).[a,b]

Condição	X_S (mg L^{-1})	*PTN* (%)
C_a, com adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia	1981 [A]	41,3 [A]
C_b, sem adição de ureia	1471 [B]	31,5 [B]
C_c, com adição de 3,1 mmol L^{-1} ureia	1624 [C]	41,0 [A]
Valor P[c]	< 0,001	< 0,001

[a] Médias dos testes usando todas as proporções de meio tratado (25, 50, 75 e 90 %)

[b] Diferentes letras maiúsculas foram usadas para as médias estatisticamente diferentes, para cada resposta avaliada, segundo MANOVA

[c] Valor *P* obtido de MANOVA, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P < 0,05$ (nível de confiança > 95 %)

6.5.4.2 *Conteúdo de proteínas*

Os valores de conteúdo total de proteínas nesta parte do trabalho, nos testes EC_1-EC_4 variaram de 23 ± 1,3 até 46 ± 0,2 % (Tabelas 10 e 12). Esses valores são um pouco menores dos reportados por Rodrigues et al. (2010), que cultivaram *A. platensis* com conteúdo de proteína de 49,3 – 51,5 % usando nitrato de potássio e cloreto de amônio em FRB abertos. Por outro lado, esses valores são maiores do que os reportados por Ferreira et al. (2010) que cultivaram biomassa de *A. platensis* com conteúdos de proteínas de 28 – 38 % em FBR da mesma configuração utilizando processo descontínuo alimentado com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

Embora tenha se reusado o meio tratado de *A. platensis* em cultivo contínuo, os valores de conteúdo total de proteína nas biomassas (*PTN*) são da mesma ordem de grandeza do que os valores (23 ± 0,9 – 56 ± 1,5 %) apresentados por Matsudo et al. (2011) em FBR da mesma configuração com ureia em processo contínuo usando meio fresco e os valores (25 – 56 %) apresentados por Matsudo et al. (2012), que avaliaram a eficiência de assimilação de CO_2 no mesmo FBR sem reuso de meio.

A Tabela 12 e o Gráfico 12 mostram que, de modo geral, houve um incremento de proteínas na biomassa quando a proporção de meio tratado diminuiu. Para cada teste, não há diferença estatística entre os valores de *PTN* na primeira e última condições avaliadas (C_a e C_c, Tabelas 10 e 12, respectivamente) devido às condições ambientais similares que foram aplicadas em esses estágios. De fato, as médias de *PTN* nestas condições (C_a e C_c) não presentaram diferença estatística ($P < 0,001$, Tabela 15).

A Gráfico 12 mostra que é possível obter biomassa com o mesmo conteúdo total de proteínas com reutilização de até 75 % de meio tratado, como foi confirmado na Tabela 13 pelo baixo valor de *P*.

O uso de 75 % de meio tratado não produz diminuição significativa (22 %) na produtividade celular entre a primeira e a última condição avaliada (C_a e C_c, respectivamente) e poderia ser utilizada para manter a qualidade de biomassa no cultivo contínuo de *A. platensis* com tratamento simultâneo de meio utilizando carvão ativado granulado. No entanto, a utilização de quantidades menores de meio tratado levam a perdas menores de produtividade, com valores da ordem de 14 % e 9 % com reuso de 50 % e 25 % de meio tratado, respectivamente.

Finalmente, como mencionado anteriormente, o reuso de meio leva a diminuição nos custos de produção. Considerando uma aplicação de *CAG* durante 10 d (T_c = 10 – 19 d) (Gráfico 11), a equação $C = 46,02 - 0,40\ p$ ($R^2 = 1,00$) descreve a relação entre o custo do meio de cultivo (C, R$ m^{-3}) (US$ 1 = R$ 2,36, 19/09/2014) e a proporção de meio tratado (p, %). Se o custo de meio fresco é R$ 46,00 m^{-3}, quando 75 % meio tratado foi reusado, o custo diminuiu até R$ 15,90 m^{-3} que representa 65 % de redução no custo de produção de meio de cultivo.

Esta parte do trabalho permite concluir que o acoplamento de processo contínuo de cultivo e o correspondente tratamento simultâneo de meio exaurido, desde que corrigida a concentração de nutrientes, particularmente ureia, pode ser viabilizado, com economia de matérias-primas, diminuindo a demanda hídrica deste

processo de produção, e, evitando impactos ambientais do lançamento de meios residuais em corpos hídricos ou no solo.

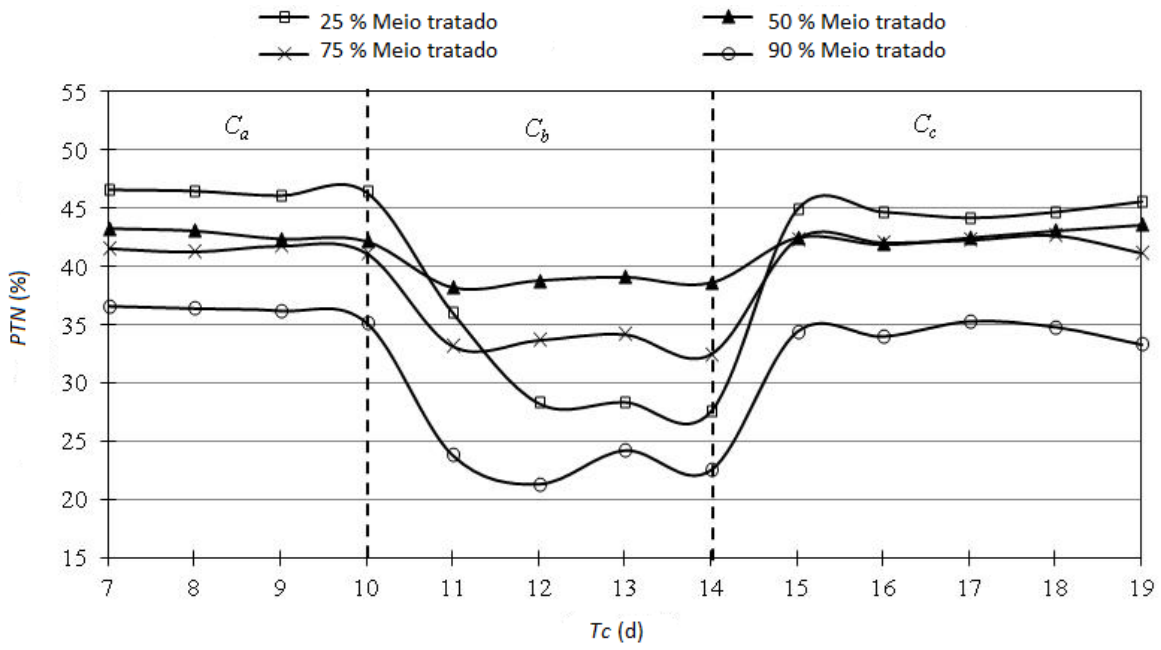

Gráfico 12 – Conteúdo total de proteínas (*PTN*) em função do tempo de cultivo utilizando diferentes proporções de meio tratado.

7 CONCLUSÕES

O trabalho permitiu cultivar *Arthrospira platensis* em meio de cultivo já utilizado, proveniente de cultivo descontínuo alimentado em FBR tubular com uso de ureia como fonte de nitrogênio, após terem sido aplicados tratamentos físico-químicos de floculação com cloreto férrico (*F*) ou sulfato férrico (*S*) e adsorção com carvão ativado em pó (*CAP*) ou carvão ativado granulado (*CAG*), sob diferentes tempos de contato (*T*) para os processos de adsorção com *CAP* ou tempos de residência (*T*) para os processos com uso de *CAG* em coluna.

As variáveis dependentes: remoção de absorbância a 254 nm, RA_{254}; remoção de absorbância a 440 nm, RA_{440}; concentração celular máxima, X_m; conteúdo de clorofila-a na biomassa seca, *Chl*; conteúdo total de proteínas na biomassa seca, *PTN* e produtividade celular, P_X; foram avaliadas com planejamento experimental e aplicação da metodologia de superfície de resposta, considerando como variáveis independentes: *CAP* ou *CAG*, *F* ou *S* e *T*. A variável resposta utilizada para a otimização dos tratamentos dos meios foi X_m, obtida em frascos Erlenmeyer.

No tratamento por processo simultâneo de floculação com *F* e adsorção com *CAP*, as condições ótimas foram: *CAP* = 24,4 mg L^{-1}, *F* = 20,3 mg L^{-1} e *T* = 30,4 min. Nessas condições, os resultados foram: RA_{254} = 92,3 ± 0,6 %, RA_{440} = 95,3 ± 0,6 %, X_m = 4893 ± 33 mg L^{-1}, *Chl* = 24,3 ± 0,1 mg g^{-1} e *PTN* = 36,1 ± 0,6 %.

As condições ótimas de tratamento simultâneo de floculação com *S* e adsorção com *CAP* foram: *CAP* = 40,0 mg L^{-1}, *S* = 32,8 mg L^{-1} e *T* = 36,1 min. Sendo os resultados: RA_{254} = 68,3 ± 0.6 %, RA_{440} = 60,7 ± 0,6 %, X_m = 4863 ± 64 mg L^{-1}, *Chl* = 24,5 ± 0,6 mg g^{-1} e *PTN* = 60,1 ± 0,6 %.

No tratamento sequencial de floculação com *F* seguido de adsorção com *CAG*, as condições ótimas de tratamento foram: *CAG* = 108,4 g, *S* = 10,0 mg L^{-1} e *T* = 30,8 min, Os resultados foram: RA_{254} = 90,0 ± 0,0 %, RA_{440} = 93,0 ± 0,0 %, X_m = 3140 ± 77 mg L^{-1}, *Chl* = 35,4 ± 0,2 mg g^{-1} e *PTN* = 44,9 ± 0,0 %.

Esses resultados permitem concluir que os valores de concentração celular máxima em frascos Erlenmeyer, nos meios reutilizados após os tratamentos aplicados, foram maiores do que os valores com meio padrão Schlösser (1982) bem como dos valores com reuso de meio que não sofreu os tratamentos físico-químicos para remoção de matéria orgânica e pigmentos.

Todos os cultivos utilizando frascos Erlenmeyer com meio tratado após as condições ótimas descritas neste trabalho produziram biomassas com maiores valores de conteúdo total de proteína e clorofila-a, sendo esses valores muito superiores aos atingidos em meio padrão, destacando-se os resultados de tratamento com uso de sulfato férrico e carvão ativado em pó (*PTN* = 60,1 ± 0,6 % e *Chl* = 24,5 ± 0,6 mg g^{-1}).

Os resultados de X_m e *PTN* dos cultivos realizados em FBR tubulares com os meios tratados utilizando *CAP* e *F* (X_m = 4991 ± 161 mg L^{-1}, *PTN* = 53,8 ± 1,3 %) ou *CAP* e *S* (X_m = 4658 ± 117 mg L^{-1}, *PTN* = 57,3 ± 2,5 %) foram maiores do que os valores em meio padrão (X_m = 4241 ± 84 mg L^{-1}, *PTN* = 34,8 ± 2,6 %).

A aplicação simultânea do processo de adsorção com *CAG* em coluna no tratamento de meio exaurido no cultivo contínuo de *A. platensis* em FBR tubular permitiu remover 51 – 79 % de matéria orgânica e pigmentos. A proporção de 75 % de meio tratado (com 3,1 mmol L^{-1} ureia) no meio de alimentação do processo contínuo não produz diminuição significativa (22 %) na produtividade celular (P_X = 941 mg L^{-1} d^{-1}) quando comparado àquela obtida com processo alimentado apenas com meio fresco (P_X = 1208 ± 28 mg L^{-1} d^{-1}) e poderia ser utilizada para manter a qualidade de biomassa (*PTN* = 42,0 ± 0,6 %) no cultivo contínuo de *A. platensis* com tratamento simultâneo de meio utilizando *CAG*. No entanto, a utilização de proporções menores de meio tratado levam a perdas menores de produtividade, com valores da ordem de 14 % e 9 % com reuso de 50 % e 25 % de meio tratado, respectivamente. Particularmente, neste processo contínuo, o reuso de 75 % de meio tratado em coluna de *CAG* acarreta uma redução de 65 % no custo da produção de meio de cultivo.

Apesar da pouca informação existente sobre tratamentos físico-químicos aplicados no reuso de meios de cultivo de micro-organismos fotossintetizantes, neste trabalho foi demonstrado que a combinação dos processos de adsorção e floculação, além da sua aplicabilidade em água, pode ser utilizada em tratamentos de meios para serem reaproveitados em novos cultivos de *A. platensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[1]

ABDIN EL SHERIF, S. A.; CLEMENT, G. *Spirulina sp*. food algae: discovery of natural lakes at Wadi El Natrun in the Arab Republic of Egypt. **Oil and Gas Science and Technology – Revue de L´IFP**, Paris, v. 37, n. 1, p. 123-130, 1982.

ABU, G.; OGBONDA, K.; AMINIGO, R. Optimization studies of biomass production and protein biosynthesis in a *Spirulina sp*. isolated from an oil - polluted flame pit in the Niger Delta. **African Journal of Biotechnology,** v. 6, n. 22, p. 2550-2554, 2007.

AJAYAN, K. V.; SELVARAJU, M. Reflector based chlorophyll production by *Spirulina platensis* through energy save mode. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7591-7594, 2011.

ALVAREZ-URIARTE, J. I.; IRIARTE-VELASCO, U.; CHIMENO-ALANIS, N.; GONZALEZ-VELASCO, J. R. The effect of mixed oxidants and powdered activated carbon on the removal of natural organic matter. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 426-431, 2010.

AMY, G. L.; SIERKA, R. A.; BEDESSEM, J.; PRICE, D.; TAN, L. Molecular-size distributions of dissolved organic matter. **Journal of the American Water Works Association**, v. 84, p. 67-75, 1992.

ANDRADE JR, E. R. **Efeitos da Ozonização sobre a Remoção de Matéria Orgânica Natural de Águas Eutrofizadas**. 2004. 153 p. Dissertação de Mestrado – Escola Politécnica – Universidade de São Paulo, São Paulo.

ANNAPURNA, V. V.; DEOSTHALE, Y. G.; BAMJI, M. S. *Spirulina* as a source of vitamin A. **Plant foods for human nutrition**, v. 41, p. 125-134, 1991.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**, 14th ed. Arlington: AOAC. 1984.

BALLONI, W., TOMASELLI, L., GIOVANNETTI, L., MARGHERI, M. C. Biologia fondamentale del genere *Spirulina*. In: **Atti del Convegno: Prospettive della coltura di *Spirulina* in Italia**. Firenze, 1980. p. 49-82.

BECKER, E. W. Algae mass cultivation – production and utilization. **Processes in Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 10-14, 1981.

BELKIN, S.; BOUSSIBA, S. High internal pH conveys ammonia resistance in *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, v. 38, n. 2-3, p. 167-169, 1991.

[1] De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR 6023.

BERNHARDT, H.; CLASEN, J. Flocculation of microrganisms. **Aqua – Journal of Water Supply: Research and Technology**, v. 40, p. 76-87, 1991.

BEZERRA, R. P.; MATSUDO, M. C.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Influence of ammonium chloride feeding time and light intensity on the cultivation of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 297-305, 2008.

BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of Biotechnology***,* v. 70, p. 313-321, 1999.

BOUSSIBA, S.; RICHMOND, A. C-Phycocyanin as a storage protein in blue-green algae. **Archives of Microbiology,** v. 125, p. 143-147, 1980.

BOYD, P. W.; WATSON, A. J.; LAW, C. S.; ABRAHAM, E. R.; TRULL, T.; MURDOCH, R.; BAKKER, D. C.; BOWIE, A. R.; BUESSELER, K. O.; CHANG, H.; CHARETTE, M.; CROOT, P.; DOWNING, K.; FREW, R.; GALL, M.; HADFIELD, M.; HALL, J.; HARVEY, M.; JAMESON, G.; LAROCHE, J.; LIDDICOAT, M.; LING, R.; MALDONADO, M. T.; MCKAY, R. M.; NODDER, S.; PICKMERE, S.; PRIDMORE, R.; RINTOUL, S.; SAFI, K.; SUTTON, P.; STRZEPEK, R.; TANNEBERGER, K.; TURNER, S.; WAITE, A.; ZELDIS, J. A mesoscale phytoplankton bloom in the polar Southern ocean stimulated by iron fertilization. **Nature**, v. 407, p. 695-702. 2000.

BRADY, R. D. Activated Carbon Processes. In: **AWWA. Water Treatment Plant Design**. California-EUA: ASCE, 1997, p. 377-416.

CAPONE, D. G. Marine nitrogen fixation: what´s the fuss? **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, p. 341-348, 2001.

CARERI, M.; FURLATTINI, L.; MANGIA, A.; MUSCI, M.; ANKLAM, E.; THEOBALD, A.; VON HOLST, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina pacifica* algae: a chemometric approach. **Journal of Chromatography A**, v. 912, n. 1, p. 61-71, 2001.

CARLSON, K.; VIA, S.; BELLAMY, B.; CARLSON, M. Secondary effects of enhanced coagulation and softening. **Journal of the American Water Works Association**, v. 92, p. 63-75, 2000.

CARVALHO, J. C. M.; FRANCISCO, F. R.; ALMEIDA, K. A.; SATO, S.; CONVERTI, A. Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* by fed-batch addition of ammonium chloride at exponentially-increasing feeding rate. **Journal of Phycology**, v. 40, p. 589-597, 2004.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Ed.). **Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blücher Ltda, 2001, v. 2, p. 205-218.

CASTENHOLZ, R. W. Subsection III, Order *Oscilatoriales*. In: STANLEY, J. T.; BRYANT, M. P.; PFENNING, N.; HOLT, J. G. (Ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: William and Wilkins, 1989, v. 3, p. 1771.

CHEN, H. B.; WU, J. Y.; WANG, C. F.; FU, C. C.; SHIEH, C. J.; CHEN, C. I.; WANG, C. Y.; LIU, Y. C. Modeling on chlorophyll a and phycocyanin production by *Spirulina platensis* under various light-emitting diodes. **Biochemical Engineering Journal**, n. 53, p. 52-56, 2010.

CHEREMISINOFF, N. P. **Handbook of Water and Wastewater Treatment Technologies.** Elsevier Butterworth–Heinemann**,** 2001. 654 p.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, v. 25, 294-306, 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, v. 26, 126-131, 2008.

CHOJNACKA, K.; CHOJNACKA, A.; GÓRECKA, H. Biosorption of Cr^{3+}, Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina sp*.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the species. **Chemosphere**, v. 59, 75-84, 2005.

CHRISTENSON, L.; SIMS, R. Production and harvesting of microalgae for wastewater treatment, biofuels and bioproducts. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 686-702, 2011.

CHRONAKIS, I. S.; GALATANU, A. N.; NYLANDER, T.; LINDMAN, B. The bevaviour of protein preparation from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air/water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, p. 181-192, 2000.

CIFERRI, O. *Spirulina,* the Edible Microorganism. **Microbiological Reviews,** v. 47, n. 4, p. 551-578, 1983.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potential of *Spirulina*. **Annual Review of Microbiology**, v. 39, p. 503-526, 1985.

COHEN, Z. The chemical of *Spirulina*. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira):* physiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997, p. 175-204.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; REICHERT, C.; COSTA, J. A. V. Production of biomass and nutraceutical compounds by *Spirulina platensis* under different temperature and nitrogen regimes. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1489-1493, Sep. 2005.

CORNET, J. F.; DUSSAP, C. G.; GROS, J. B. Kinects and energetics of photosynthetic micro-organisms in photobioreactors. Aplication to *Spirulina* growth. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology,** v. 59, p. 155-194, 1998.

CROUE, J. P.; DEBROUX, J. F.; AMY, G. L.; AIKEN, G. R.; LEENHEER, J. A. In: SINGER, P. (Ed.). **AWWA**. **Formation and Control of Disinfection by-products in Drinking Water**. Denver: Denver CO, 1999, p. 65-93.

CRUZ, A. J. G.; SILVA, A. S.; ARAUJO, M. L. G. C.; GIORDANO, R. C.; HOKKA, C. O. Modelling and optimization of the cephalosporin C production bioprocess in a fed-batch bioreator with invert sugar as substrate. **Chemical Engineering Science**, v. 54, p. 3137-3142, 1999.

DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Effect of reducing the light intensity on the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 26, p. 329-335, 2004.

DANESI, E. D. G.; RANGEL-YAGUI, C. O.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. An investigation of effect of replacing nitrate by urea in the growth and production of chlorophyll by *Spirulina platensis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 261-269, 2002.

DILLON, J. C.; PHUC, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional value of the alga *Spirulina.* **Plants in Human Nutritions**, v. 77, p. 32-46, 1995.

DURAND-CHASTEL, H. **Production and use of *Spirulina* in Mexico**. In: SHELEF, G.; SOEDER, C. J. (Ed.). **Algae biomass**. Amsterdam: Biomedical Press, 1980, p. 851.

EBIE, K.; LI, F.; AZUMA, Y.; YUASE, A.; HAGISHITA, T. Pore distribution effect of activated carbon in adsorbing organic micropollutants from natural water. **Water Research**, v. 35, n. 1, p. 167-179, 2001.

ECHEGARAY, O.; CARVALHO, J.; FERNANDES, A.; SATO, S.; AQUARONE E.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugarcane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation, **Biomass and Bioenergy**, n. 19, p. 39-50, 2000.

EDZWALD, J. K.; BEKER, W. C.; WATTIER, L. Surrogate parameters for monitoring organic matter and THM precursors. **Journal of the American Water Works Association**, v. 77, p. 122-131, 1985.

FAINTUCH, B. L. **Análise comparativa da produção de biomassa a partir de três cianobactérias empregando distintas fontes nitrogenadas**. 1989. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

FERRARI, G. M.; TASSAN, S. A method using chemical oxidation to remove ligth absoption by phytoplankton pigments. **Journal of Phycology**, n. 35, p. 1090-1089, 1999.

FERRAZ, C. A. M. Produção de *Spirulina maxima*: Influência de ecofatores e uso de um subproduto da indústria alcooeira. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 70-74, 1986.

FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. A new approach to ammonium sulphate feeding for fed-batch *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor. **Biotechnology Progress**, v. 26, p. 1271-1277, 2010.

FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. *Arthrospira (Spirulina) platensis* cultivation in tubular photobioreactor: Use of no-cost CO_2 from ethanol fermentation. **Applied Energy**, v. 92, 379-385, 2012.

FRATELLI, F.; SIQUINI,T. J.; PRADO, A. M. A.; HIGASHI, H. G. Effect of medium composition on the production of tetanus toxin by *Clostridium tetani*. **Biotechnology Progress**, v. 21, 756-761, 2005.

FUNTEU, F.; GUET, C.; WU, B.; TRÉMOLIÈRES, A. Effects of environmental factors on the lipid metabolism in *Spirulina platensis.* **Plant Physiology Biochemistry,** v. 35, p. 63-71, 1997.

GRIMA, M.; BELARBI, E. H.; FERNANDEZ, F. G. A.; MEDINA, A. R.; CHISTI, Y. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances,** v. 20, n. 7-8, p. 491-515, 2003.

GUGLIELMI, G.; RIPPKA, R.; TANDEAU DE MARSAC, N. Main properties that justify the different taxonomic position of *Spirulina spp*. and *Arthrospira spp*. among Cyanobacteria. **Bulletin of the Institute of Oceanography***,* Monaco, v. 12, p. 13, 1993.

HANIGAN, D.; ZHANG, J.; HERCKES, P.; KRASNER, S. W.; CHEN, C.; WESTERHOFF, P. Adsorption of N-nitrosodimethylamine precursors by powdered and granular activated carbon. **Environmental Science and Technology**, v. 46, n. 22, p. 12630-12639, 2012.

HERRERO, M.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. **Food Chemistry**, v. 93, n. 3, p. 417-423, 2005.

HOLMAN, B. W. B.; MALAU-ADULI, A. E. O. *Spirulina* as a livestock supplement and animal feed. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 615-623, 2013.

HONGSTHONG, A.; SIRIJUNTARUT, M.; PROMMEENATE, P.; THAMMATHORN, S.; BUNNAG, B.; CHEEVADHANARAK, S.; TANTICHAROEN, M. Revealing differentially expressed proteins in two morphological forms of *Spirulina platensis* by proteomic analysis. **Molecular Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 123-130, 2007.

JAGUARIBE, E. F.; MEDEIROS L. L.; BARRETO M. C. S.; ARAÚJO L. P. The performance of activated carbons from sugarcane bagasse, babassu, and coconut shells in removing residual chlorine. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v 22, n. 1, p. 41-47, 2005.

JENSEN, S.; KNUTSEN, G. Influence of light and temperatura on photoinhibition of photosynthesis in *Spirulina platensis*. **Journal of Applied Phycology**. v. 5, p. 495-504, 1993.

JIMÉNEZ, C.; COSSÍO, B. R.; LABELLA, D.; NIELL, F. X. The feasibility of industrial production of *Spirulina* (*Arthrospira*) in Southern Spain. **Aquaculture**, v. 217, n. 1-4, p. 179-190, 2003.

JOHIR, M. A. H.; VIGNESWARAN. S.; KANDASAMY, J.; SLEIGH R. Coupling of physico-chemical treatment and steel membrane filtration to enhanced organic removal in wastewater treatment. **Desalination and Water Treatment**, v. 51, p. 2695-2701, 2013.

JOURDAN, J. P. **Cultivez votre spiruline – Manuel de culture artisanale pour la production de *Spiruline*.** France, 2006. 146 p.

KABSCH-KORBUTOWICZ, M. Effect of Al coagulant type on natural organic matter removal efficiency in coagulation/ultrafiltration process. **Desalination**, n. 185, v. 1-3, p. 327-333, 2005.

LEDUY, A.; THERIEN, N. An improved method for optical density measurement of the semicroscopic blue algae *Spirulina maxima*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 19, p. 1219-1224, 1977.

LEE, B.; KIM, J. K. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Engineering**, v. 25, n. 20, p. 111-124, 2001.

LEMES, A. C.; TAKEUCHI, K. P.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. Brazilian Archives of Biology and Technology, v. 55, n. 5, p.741-750, 2012.

LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from Microalgae. **Biotechnology Progress**, v. 24, p. 815-820, 2008.

LITCHFIELD, J. H. Single cell protein. **Food technology.** v. 31, p. 175-179, 1977.

LODI, A.; BINAGHI, L.; DE FAVERI, D.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Fed-batch mixotrophic cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* (Cyanophycea) with carbon source pulse feeding. **Annals of Microbiology**. v. 55, n. 3, p. 181-185, 2005.

LODI, A.; SOLETTO, D.; SOLISIO, C.; CONVERTI, A. Chromium (III) removal by *Spirulina platensis* biomass. **Chemical Engineering Journal**, n. 136, p. 151-155. 2008.

MAHAJAN, G.; KAMAT, M. γ-Linolenic acid production from *Spirulina platensis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 43, p. 466-469, 1995.

MARKOU, G.; VANDAMME, D.; MUYLAERT, K. Using natural zeolite for ammonia sorption from wastewater and as nitrogen releaser for the cultivation of *Arthrospira platensis*. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 373-378, 2014.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. CO_2 from alcoholic fermentation for continuous cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* in tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Biotechnology Progress**, v. 27, p. 650-656, 2011.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; SATO, S.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Repeated fed-batch cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using urea as nitrogen source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, p. 52-57, 2009.

MATSUDO, M. C.; BEZERRA, R. P.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Photosynthetic efficiency and rate of CO_2 assimilation by *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* continuously cultivated in a tubular photobioreactor. **Biotechnology Journal**, v. 7, p. 1412-1417, 2012.

MOORE, B. C.; CANNON, F. S.; WESTRICK, J. A.; METZ, D. H.; SHRIVE, C. A.; DEMARCO, J.; HARTMAN, D. J. Changes in GAC pore structure during full-scale water treatment at Cincinnati: A comparison between virgin and thermally reactivated GAC. **Carbon**, v. 35, p. 789-807, 2001.

MORIST, A.; MONTESINOS, J. L.; CUSIDÓ, J. A.; GÒDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 535-547, 2001.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; CARVALHO, J. C. M. *Arthospira platensis* growth and biomass can be influenced by ferric sulfate and EDTA presence in Schlösser medium. In: **27° CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA**, Natal-Brasil. Anais, 2013a.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; CARVALHO, J. C. M. Ferric salts could influence on *Arthrospira platensis* growth and biomass composition. In: **7th INTERNATIONAL ALGAE CONGRESS**, Hamburg-Netherlands. On-line, 2013b.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; CONVERTI, A.; SATO S.; CARVALHO J. C. M. Kinetic and thermodynamic investigation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* fed-batch cultivation in a tubular photobioreactor using urea as nitrogen source. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 87, n. 11, p. 1574-1583, 2012.

MOSULISHVILI, L. M.; KIRKESALI, E. I.; BELOKOBYLSKY, A. I.; KHIZANISHVILI, A. I.; FRONTASYEVA, M. V.; PAVLOV, S. S.; GUNDORINA; S. F. Experimental substantiation of the possibility of developing selenium- and iodine-containing pharmaceuticals based on blue-green algae *Spirulina platensis*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 1, p. 87-97, 2002.

NAES, H.; POST, A. F. Transient states of geosmin, pigments, carbohydrates and proteins in continuous cultures of *Oscillatonia breves* induced by changes in nitrogen supply. **Archives of Microbiology**, v. 150, p. 333-337, 1988.

NAJM, I.; TATE, C.; SELBY, D. Optimizing enhanced coagulation with PAC: a case study. **Journal of the American Water Works Association**, v. 90, p. 88-95, 1998.

NIKEREL, I. E.; TOKSOY, E.; KIRDAR, B.; YILDIRIM, R. Optimizing medium composition for TaqI endonuclease production by recombinant *Escherichia coli* cells using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1633-1639, 2005.

NILSON, J. A.; DIGIANO, F. A. Influence of NOM composition on nanofiltration. **Journal of the American Water Works Association**, v. 88, p. 53-66, 1996.

ODEGAARD, H. **Chemical Floc Formation in Wastewater Treatment - An Introduction**. Progress Water Technology, Pergamon Press, 1979. v. 1. p. 103-110.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; CAMACHO, R.; MERCADO, G. Production of *Spirulina sp*. in sea water supplemented with anaerobic effluents in outdoor raceways under temperate climatic conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 48, p. 242-247, 1997.

OLGUÍN, E. J.; GALICIA, S.; HERNÁDEZ, E. ANGULO, O. The effect of low light flux and nitrogen deficiency on the chemical composition of *Spirulina sp*. Growth on pig waste. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 19-24, 2001.

OWEN, D. M.; AMY, G. L.; CHOWDHURY, Z. K.; PAODE, R.; MCCOY, G.; VISCOSIL, K. NOM – characterization and treatability. **Journal of the American Water Works Association**, v. 87, p. 46-63, 1995.

PANE, L.; SOLISIO, C.; LODI, A.; MARIOTTINI, G. L.; CONVERTI, A. Effect of extracts from *Spirulina platensis* bioaccumulating cadmium and zinc on L929 cells. **Ecotoxicology Environment Safety,** v. 70, n. 1, p. 121-126. 2008.

PAOLETTI, C.; PUSHPARAJ, B.; TOMASELLI, L. Ricerche sulla nutrizione minerale di *S. platensis*. In: **Atti del Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia**, 17, 26-28 ott. 1975, Padova, Italia. Società Italiana di Microbiologia, v. 2, 1975. p. 845-853.

PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O.; SASSANO, C. E. N.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S.; MORAES, I. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **Journal of Food Engeneering**, v. 56, p. 371-375, 2003.

PIERCE, W. C.; HAENISCH, E. L. **Quantitative Analysis**. New York: John Willey e Sons Inc., 3th ed, 1948.

PIORRECK, M.; HINNERK, K.; POHL, B.; POHL, P. Biomass production, total protein chlorophylls, lipids and fatty acids of freshwater green and blue green algae under different nitrogen regimes. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 207-216, 1984.

PULTZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 65, p. 635-648, 2004.

PULZ, O.; SCHEIBENBOGEN, K. Photobioreactors: Design and performance with respect to light energy input. **Advances in Biochemistry Engineering and Biotechnology**, v. 41, p. 124-48, 1998.

RABELO, S. F.; LEMES, A. C.; TAKEUCHI, K. P.; FRATA, M. T.; CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Development of cassava doughnuts enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Journal of Food Technology** (Online), v. 16, p. 42-51. 2013.

RAFIQUL, I. M.; JALAL, K. C. A.; ALAM, M. Z. Environmental factors for optimization of *Spirulina* biomass in laboratory culture. **Biotechnology**, v. 4, n. 1, p. 19-22, 2005.

RANGEL-YAGUI, C. O.; DANESI, E. D. G.; CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Bioresource Technology**, v. 92, p. 133-141, 2004.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology.** Blackwell Science Ltd, 2004.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. **Micro-algal Biotechnology.** Cambridge: Cambridge University Press, 1988, p. 85-121.

RODRIGUES, A. **Contribuição ao estudo do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica**. 1998. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 1998.

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CARVALHO, J. C. M.; LODI, A.; FINOCCHIO, E.; CONVERTI, A. Metal biosorption onto dry biomass of *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* and *Chlorella vulgaris*: Multi-metal systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 217-218, p. 246-255, 2012

RODRIGUES, M. S.; FERREIRA, L. S.; CONVERTI, A.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Fed-batch cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis*: Potassium nitrate and ammonium chloride as simultaneous nitrogen sources. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4491-4498, 2010.

ROSELLO–SASTRE, R.; CSÖGÖR Z.; PERNER–NOCHTA, I.; FLECK–SCHNEIDER P.; POSTEN, C. Scale-down of microalgae cultivations in tubular photo-bioreactors – a conceptual approach. **Journal of Biotechnology,** n. 132, p. 127-133, 2007.

SAMUELSON, G.; LÖNNEBORG, A.; ROSENQVIST, E.; GUSTAFSSON, P.; ÖQUIST, G. Photoinhibition and reactivation of photosynthesis in the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. **Plant Physiology**, v. 79, p. 992-995, 1985.

SANCHEZ-LUNA, L. D.; BEZERRA, R. P.; MATSUDO, M. C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Influence of pH, temperature, urea molar flow rate on *Arthrospira platensis* fed-batch cultivation: a kinetic and termodynamic approach. **Biotechnology and Bioengeneering**, v. 96, n. 4, p. 702-711, 2007.

SANTOS, K. R. S. **Estudos de desenvolvimento, moleculares e do potencial biotecnológico em cepas de cianobactérias provenientes de lagoas salinas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil: *Anabaenopsis elenkinii* (Nostocales) e *Arthrospira platensis* (Oscillatoriales).** 2013. Tese de Doutorado – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2013.

SASSANO, C. E. N. **Cultivo de *Spirulina platensis* por processo contínuo utilizando cloreto de amônio como fonte de nitrogênio**. 2004. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

SASSANO, C. E. N.; GIOIELLI, L. A.; FERREIRA, L. S.; RODRIGUES, M. S.; SATO, S.; CONVERTI, A; CARVALHO, J. C. M. Evaluation of the composition of continuously-cultivated *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* using ammonium chloride as nitrogen source. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, p. 1732-1738, 2010.

SASSI, A. H.; FAUVART, L.; DESCHAMPS, A. M.; LEBEAULT, J. M. Fed-batch production of L–lysine by *Corynebacterium glutamicum*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 1, p. 85-90, 1998.

SAXENA, P. N.; AHMAD, M. R.; SHYAM, R. Cultivation of *Spirulina* in sewage for poultry feed. **Amnia Experientia**, v. 39, p. 1077-1083, 1983.

SCHLÖSSER, U. G. Sammlung von Algenkulturen. **Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft**, v. 95, p. 181-276, 1982.

SHELEF, G.; SUKENIK, A., GREEN, M. **Microalgae harvesting and processing: a literature review**. Haifa-Israel: Technion Research and Development Foundation Ltd., 1984.

SHEN, Y.; YUAN, W.; PEI, Z.J.; WU, Q.; MAO, E. Microalgae mass production methods. **Transactions of the ASABE,** v. 52, p. 1275-1287, 2009.

SHON, H. K.; VIGNESWARAN, S.; KIM, I. S.; CHO, J.; NGO, H. H. The effect of pretreatment to ultrafiltration of biologically treated sewage effluent: a detailed effluent organic matter (EfOM) characterization. **Water Research**, v. 38, p. 1933-1939, 2004.

SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1119-1124, 2001.

SNOEYINK, V. Adsoption of organic compounds. In: CHORUS, I.; BARTRAM, J. (Ed.). **Toxic Cyanobacteria in Water – A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management**. Londres: E&FN Spon, 1990, p. 41-111.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; FERRARI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; ZILLI, M.; CONVERTI, A. Effects of carbon dioxide feeding rate and light intensity on the fed-batch pulse-feeding cultivation of *Spirulina platensis* in helical photobioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 2, p. 369-375, 2008.

SOLETTO, D.; BINAGHI, L.; LODI, A.; CARVALHO, J. C. M.; CONVERTI, A. Batch and fed-batch cultivations of *Spirulina platensis* using ammonium sulphate and urea as nitrogen sources. **Aquaculture**, v. 243, p. 217-224, 2005.

SOLISIO, C.; LODI, A.; TORRE, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Copper removal by dry and re-hydrated biomass of *Spirulina platensis*. **Bioresource Technology**, n. 97, p. 1756-1760, 2006.

SONG, Z.; WILLIAMS, C. J.; EDYVEAN, R. G. J. Treatment of tannery wastewater by chemical coagulation. **Desalination**, v. 164, p. 249-259, 2004.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal Bioscience and Bioengineering**, n. 101, p. 87-96, 2006.

STANCA, D.; POPOVIC, E. Urea as nitrogen source in modified Zarrouk medium. **Review Roumain de Biology Animals**, v. 41, n. 1, p. 25-31, 1996.

TACON, A.; JACKSON, A. Utilization of conventional and unconventional source in practical fish feeds. In: **Nutrition and feeding in fish.** London: Academic Press, 1985. p.119-145.

TAKEUCHI, T.; LU, J.; YOSHIZAKI, G.; SATOH, S. Effect on the growth and body composition of juvenile tilapia *Oreochromis niloticus* fed raw *Spirulina*. **Fisheries Science**, v. 68, p. 34-40, 2002.

TAN, X. Y.; LUO, Z.; LI, X. D.; ZHANG, S. L.; SUN, Z. Z. Effect of dietary fish meal replacement by different levels of alga *Spirulin*a meal on growth performance and body composition of sea cucumber *Apostichopus japonicus*. **Journal of Dalian Fisheries University**, v. 24, p. 559-562, 2009.

TANTICHAROEN, M.; REUNGJITCHACHAWALI, M.; BOONAG, B.; VONKTAVEESUK, P.; VONSHAK, A.; COHEN, Z. Optimization of γ-linolenic acid (GLA) production in *Spirulina platensis.* **Journal of Applied Phycology**, v. 6, n. 3, p. 295-300, 1994.

TOMASELLI, L. Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis*. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis* (*Arthrospira*)*:* phisiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997, p. 79-99.

TRAVIESO, L.; HALL, D. O.; RAO, K. K.; BENÍTEZ, F.; SÁNCHEZ, E.; BORJA, R. A helical tubular photobioreactor producing *Spirulina* in a semicontinuous mode. International. **Biodeterioration and Biodegradation**, v. 47, p. 151-155, 2001.

UDUMAN, N.; QI, Y.; DANQUAH, M. K.; FORDE, G. M.; HOADLEY, A. Dewatering of microalgal cultures: a major bottleneck to algae-based fuels. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 2, 012701, 2010.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Carvalho, J. C. M.; Sato, S.; Morocho-Jácome, A. L. **Método de reaproveitamento de efluente a partir do cultivo de microrganismos fotossintetizantes, usos do método de reaproveitamento e usos do material orgânico reaproveitado**. BR n. PI 018100034532, 16 setembro 2010. 8 janeiro 2013.

UYAK, V.; YAVUZ, S.; TOROZ, I.; OZAYDIN, S.; GENCELI, E. A. Disinfection by-products precursors removal by enhanced coagulation and PAC adsorption. **Desalination**, v. 216, 334-344, 2007.

VELTEN, S.; KNAPPE, D. R.; TRABER, J.; KAISER, H. P.; VON GUNTEN, U.; BOLLER, M.; MEYLAN, S. Characterization of natural organic matter adsorption in granular activated carbon adsorbers. **Water Research**, v. 45, p. 3951-3959, 2011.

VIEIRA, D. C. M.; MATSUDO, M. C.; SATO, S.; CONVERTI, A.; CARVALHO, J. C. M. Simultaneous use of urea and potassium nitrate for *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* cultivation. **Biotechnology Journal**, v. 6, 649-655, 2012.

VOGEL, A. I. **Análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Ltda., 2002. p. 462.

VONSHAK, A. *Spirulina*: Growth, Physiology and Biochemistry. In: VONSHAK, A. (Ed.). ***Spirulina platensis (Arthrospira*): phisiology, cell-biology and biotechnology**. London: Taylor and Francis, 1997. p. 43-66.

VONSHAK, A.; BOUSSIBA, S.; ABELIOVICH, A.; RICHMOND, A. Production of *Spirulina* Biomass: maintenance of monoalgal culture outdoors. **Biotechnology and Bioengineering,** v. 25, n. 2, p. 341-349, 1983.

WATANABE, Y.; HALL, D. O. Photosynthetic CO_2 conversion technologies using a photobioreactor incorporating microalgae – energy and material balances. **Energy Conversion and Management**, v. 37, p. 1321-1326, 1996.

WEISHAAR, J. L.; AIKEN, G. R.; BERGAMASCHI, B. A.; FRAM, M. S.; FUJII, R.; MOPPER K. Evaluation of specific ultraviolet absorbance as an indicator of the chemical composition and reactivity of dissolved organic carbon. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 4702-4708, 2003.

WEISSMAN, J. C.; GOEBEL, R. P. **Design and analysis of microalgal open pond systems for the purpose of producing fuels: a subcontract report.** U.S. DOESERI; 1987.

XIE, L.; WANG, D. L. C. Fed-batch cultivation of animal cell using different medium design concepts and feeding strategies. **Biotechnology and Bioengeneering**, v. 10, n. 11, p. 1175-1189, 1994.

YAN, M. Q. **Enhanced coagulation and treatment system optimization for high alkalinity and micro-polluted water.** 2006. Tese de Doutorado – Research Center for Eco-Environmental Sciences – Chinese Academy of Sciences, Beijing.

YAN, M. Q.; WANG, D. S.; NI, J. R.; QU, J. H.; CHOW C. W. K. Enhanced coagulation for high alkalinity and micro-polluted water: The third way through coagulant optimization. **Water Research**, v. 42, p. 2278-2286, 2008a.

YAN, M. Q.; WANG, D. S.; SHI, B. Y.; WANG, M.; YAN, Y. Effect of pre-ozonation on optimized coagulation of a typical North-China source water. **Chemosphere**, v. 69, p. 1695-1702, 2007.

YAN, M. Q.; WANG, D. S.; YOU, S. J.; QU, J. H.; TANG, H. X. Enhanced coagulation in a typical North-China water treatment plant. **Water Research**, v. 40, p. 3621-3627, 2006.

YAN, M. Q.; WANG, D.; NI, J.; QU, J.; NI, W.; VAN LEEUWEN, J. Natural organic matter (NOM) removal in a typical North-China water plant by enhanced coagulation: Targets and techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 68, p. 320-327, 2009.

YAN, M. Q.; WANG, D. S.; QU, J. H.; NI, J. R.; YAN, Y.; CHOW, C. Effect of polyaluminum chloride on enhanced softening for the typical organic-polluted high hardness North-China surface waters. **Separation and Purification Technology**, v. 62, p. 401-406, 2008b.

ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques er chimiques sur la croissance er la photosynthése de *Spirulina maxima* (Setch. Et Gardner) Geitler**. 1966. Tese de Doutorado – Universidade de Paris, Paris.

ANEXOS

ANEXO A

LISTA DE MANUSCRITOS

Artigos relacionados a esta Tese e submetidos para avaliação em revistas de circulação internacional:

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Sustainable reuse of *Arthrospira platensis* medium with physicochemical treatment Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Innovative treatment with powdered activated carbon and ferric sulfate to reuse *Arthrospira platensis* medium. Journal of Chemical Technology and Biotechnology.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Physicochemical treatment to reuse spent medium in *Arthrospira platensis* cultivation. Engineering in Life Sciences.

MOROCHO-JÁCOME, A. L.; MASCIOLI, G. F.; SATO, S.; CARVALHO, J. C. M. Continuous cultivation of *Arthrospira platensis* using exhausted medium treated with granular activated carbon. Journal of Hydrology.